Einfluß extrazellulär und intrazellulär wirkender Thioloxidantien auf die ^{45}Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Rolf G. Hägele
aus Balingen

1981

81 278

Einfluß extrazellulär und intrazellulär wirkender Thioloxidantien auf die ^{45}Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Rolf G. Hägele
aus Balingen

1981

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 1981

Dekan: Prof. Dr. E. Reinhard

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meiner Frau

und meiner Mutter

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im November 1978 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im April 1981 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Dr. N. Youssif danke ich für die gute Zusammenarbeit während der Versuche zur Methodik.

Den Mitarbeitern des Isotopenlabors der Universität Tübingen möchte ich für die stete Hilfsbereitschft und Unterstützung in technischen Fragen danken.

Weiter gilt mein herzlicher Dank allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für die ständige Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

A B K Ü R Z U N G E N

cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
t-BHP	tertiäres Butylhydroperoxid
pCMB	para-Chlormercuribenzoat
pCMBS	para-Chlormercuribenzolsulfonsäure
CPDS	Bis-(5-carboxy-2-pyridyl)disulfid
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
DIP-Salz	Dijodsalz des Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazids)
DTMB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
ε	molarer Extinktionskoeffizient
EGTA	Bis-(aminoäthyl)-glycoläther-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESR	Extern standard ratio
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IRI	Immunreaktives Insulin
KRB-Lösung	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert

PPS	Pentosphosphatshunt
SEM	Standard error of the mean
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.1.1	Calcium und Insulinsekretion	1
1.1.2	Membranthiole und Insulinsekretion	8
1.2	Fragestellung	15
2.	MATERIAL	17
2.1	Versuchstiere	17
2.2	Geräte	17
2.3	Chemikalien und Enzyme	18
2.3.1	Bezogene Chemikalien und Enzyme	18
2.3.2	Eigensynthetisierte Stoffe	18
2.4	Elektrolytlösungen	26
2.4.1	Hanks' Lösung	26
2.4.2	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	26
2.4.3	Tris-Puffer	28
2.4.3.1	Tris-Puffer mit physiologischer Calciumkonzentration	28
2.4.3.2	Tris-Puffer mit verminderter Calciumkonzentration	28
2.5	Inkubationsmedien	29
2.5.1	Medien für die Versuche 4.1 bis 4.3	29
2.5.2	Medien für den Versuch 4.4	30
2.5.3	Medien ab Versuch 4.5	31
3.	EXPERIMENTELLER TEIL	33
3.1	Aufstellung einer modifizierten Methode zur Bestimmung des aufgenommenen Calciums in Langerhansschen Inseln	33
3.1.1	Reaktions- und Inkubationsgefäße	35
3.1.2	^{45}Calcium und seine Bestimmung im β-Counter	37

3.1.3	Leerwertversuche zur Standardisierung des Backgrounds	43
3.2	Isolierung Langerhansscher Inseln nach Lacy und Kostianovsky	52
3.3	Vorinkubation	53
3.4	Hauptinkubation	54
3.5	Kurzspülinkubation	54
3.6	Lanthanfixierinkubation	55
3.7	Umrechnung der Meßergebnisse (cpm) in ^{45}Calciumaufnahme (mol/10 Inseln)	55
3.8	Insulinbestimmung	59
4.	ERGEBNISSE	61
4.1	Einfluß von verschiedenen Glucosekonzentrationen auf die Aufnahme von ^{45}Calcium in Langerhanssche Inseln der Ratte, bei einer Calciumkonzentration von 0,04 mM im Inkubationsmedium	61
4.2	Einfluß von tertiärem Butylhydroperoxid auf die glucoseinduzierte Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte	61
4.3	Einfluß von Diamid auf die glucoseinduzierte Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte	64
4.4	Einfluß von verschiedenen Glucosekonzentrationen auf die Aufnahme von ^{45}Calcium in Langerhanssche Inseln der Ratte, bei einer Calciumkonzentration von 2,6 mM im Inkubationsmedium	67
4.5	Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte	67
4.6	Einfluß von DIP und DIP-Salz auf die Calciumaufnahme isolierter Pankresinseln der Ratte	70

4.6.1 Einfluß von DIP auf die Calciumaufnahme isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte unter einer die Insulinsekretion stimulierenden Glucosekonzentration 70
4.6.2 Einfluß von DIP auf die Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte unter einer die Insulinsekretion nicht stimulierenden Glucosekonzentration 75
4.6.3 Einfluß von DIP-Salz auf die Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln unter einer die Insulinsekretion stimulierenden Glucosekonzentration 75
4.6.4 Einfluß von DIP-Salz auf die Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln unter einer die Insulinsekretion nicht stimulierenden Glucosekonzentration 78
4.6.5 Einfluß von DIP plus DIP-Salz in äquimolaren Konzentrationen auf die Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln unter einer die Insulinsekretion nicht stimulierenden Glucosekonzentration 83

5. DISKUSSION 87
5.1 Allgemeines zur Bedeutung des Calciums für die Zellfunktion 87
5.1.1 Calciumverteilung in der β-Zelle im Ruhezustand 87
5.1.2 Calciumfluxe durch Zellmembrane und intrazelluläre Umverteilung 88
5.1.3 Beziehungen zwischen der Änderung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration und der Insulinsekretion 90
5.2 Versuche zur Optimierung des Versuchsablaufes bei der Bestimmung von Calcium in Langerhansschen Inseln 94

5.2.1	Modifizierung der von Hellman (1978) beschriebenen "Lanthanmethode" zur Bearbeitung der gegebenen Fragestellung: Bedeutung von Thiolgruppen für transmembrane Calciumfluxe	94
5.2.1.1	Allgemeines zu dieser Methode	94
5.2.1.2	Spezielle Waschverfahren zur Backgrounderniedrigung bei der ^{45}Calciummessung	98
5.2.1.3	Optimierung der Inkubationszeiten, die zur Ermittlung der Aufnahme meßbarer Calciummengen in der Insel notwendig waren	99
5.2.1.4	Änderung der Mediumskonzentrationen an Calcium und daraus resultierende Änderung der spezifischen Aktivität	101
5.3	Membranthiole, Calciumaufnahme und intrazelluläres Glutathionsystem	102
5.3.1	Intrazelluläre Effekte von t-BHP und Diamid auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln	102
5.3.2	Extrazelluläre Effekte von DIP-Salz an der Langerhansschen Insel in Gegenwart von verschiedenen Glucosekonzentrationen	105
5.3.2.1	Extrazelluläre Effekte in Gegenwart stimulatorischer Glucosekonzentration von 20 mM	105
5.3.2.2	Extrazelluläre Effekte von DIP-Salz in Gegenwart einer nicht stimulatorischen Glucosekonzentration von 3 mM	106

6.	ZUSAMMENFASSUNG	109
6.1	Fragestellung	109
6.2	Ergebnisse im methodischen Teil	109
6.3	Versuchsergebnisse	110
6.4	Schlußfolgerung	111
7.	LITERATURVERZEICHNIS	113

1. E I N L E I T U N G

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Calcium und Insulinsekretion

Dem Calcium, beziehungsweise seiner Aufnahme, Abgabe und intrazellulären Verteilung, wird heute eine zentrale Stellung im Mechanismus der Sekretion von Insulin zugesprochen. Die Erhöhung der freien Calciumkonzentration im Cytoplasma ist Voraussetzung für die Insulinsekretion, was bei verschiedenen in-vitro-Präparationen (isolierte Inseln, isoliert perfundiertes Pankreas) von verschiedenen Tierspezies (Ratte, Maus, Kaninchen) bestätigt werden konnte (Malaisse et al., 1973; Sugden et Ashcroft, 1978; Frankel et al.,1978).

Auch in-vivo-Befunde, wonach einer Hypocalciämie eine Hemmung der Insulinsekretion folgt (Little-Dike et al., 1968), deuten auf die Schlüsselstellung dieses Ions bei der Physiologie der Insulinsekretion hin.

Die Veränderung der freien Calciumkonzentration im Cytoplasma wird durch folgende Mechanismen gesteuert:

A. Die Calciumaufnahme in die Zelle aus dem Extrazellulärraum

B. Die intrazelluläre Umverteilung von Calcium

C. Die Calciumabgabe aus der Zelle in den Extrazellulärraum

A. Die Calciumaufnahme

Die Beziehung der Calciumaufnahme zur Insulinsekretion ist von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, daß die Insulinsekretion von

der Calciumaufnahme abhängig ist (Hellman et al., 1971; Malaisse-Lagae et Malaisse, 1971; Henquin et Lambert, 1975; Naber et al., 1977).

Die D-Glucose, der bedeutendste physiologische Sekretionsstimulus, steigert sowohl die Nettoaufnahme von ^{45}Calcium je nach Meßmethode um das 2- bis 3-fache (Zentrifugation durch Ölschicht: Malaisse et al., 1977; Lanthanmethode: Hellman et al., 1976), als auch den ^{40}Calciumgehalt um das 2-fache (Atomabsorptionsmethode: Boschero et al., 1977). Herrman und Mitarbeiter (1973) sowie Schäfer und Klöppel (1974 b) fanden mit Hilfe der Pyroantimonatmethode eine Vermehrung der histochemischen Flecken für Calcium nach Gabe von D-Glucose.

Die Aufnahme von ^{45}Calcium ist dosisabhängig von der Glucosekonzentration (von 0 bis 20 mM), und das bei breiter Streuung der extrazellulären Calciumkonzentrationen von 16 µM bis 2,6 mM (Hellman et al., 1977). Wird die Calciumkonzentration im Medium auf 0 gesenkt, kommt auch die Insulinsekretion nach Glucosegabe zum Erliegen (Milner et Hales, 1967; Curry et al., 1968; Malaisse et al., 1968; Lambert et al., 1969; Grodsky, 1972; Hellman et al., 1973; Somers et al., 1979).

Auch andere bekannte Stimulantien der Insulinsekretion, wie D-Mannose, L-Leucin und Tolbutamid steigern die Calciumaufnahme in isolierte Langerhanssche Inseln (Hellman et al., 1977). Das Thiolreagens para-Chlormercuribenzolsulfonsäure (CMBS), das ebenfalls die Insulinsekretion stimuliert, erhöht die Calciumaufnahme in mikrodisezierte ob-ob-Mausinseln (Hellman et al., 1975).

Andererseits wird die basale Calciumaufnahme nicht verändert durch Verbindungen, bei denen die Fähigkeit fehlt, die Insulinfreisetzung zu stimulieren, wie 3-O-Methylglucose, L-Glucose, D-Galaktose, D-Leucin (Ma-

laisse-Lagae et Malaisse, 1971).

Darüberhinaus führen Stoffe, wie Mannoheptulose, L-Adrenalin und Diazoxid, die die Insulinsekretion trotz stimulatorischer Glucosekonzentrationen hemmen, auch zu einer Hemmung der Calciumaufnahme (Malaisse-Lagae et Malaisse, 1971; Hellman et al., 1977).

B. Die intrazelluläre Umverteilung von Calcium

Die intrazelluläre Dislokation zur Erhöhung der Calciumkonzentration im Cytoplasma wird durch Arbeiten belegt, die die Verteilung von Calcium zwischen Depot-Organellen und Cytoplasma und seine Kinetik an einzelnen Fraktionen der β-Zelle untersuchten. Als Depot-Organellen spielen bei der Langerhansschen Insel, wie in anderen Zellen, das endoplasmatische Retikulum und vor allem die Mitochondrien eine entscheidende Rolle (Schäfer, 1980).

Sugden und Ashcroft fanden (1978) einen Zusammenhang zwischen dem Glucosemetabolismus und der Calciumaufnahme von Mitochondrien. Steigt die Konzentration von Phosphoenolpyruvat nach Glucosegabe an, wird die Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien gehemmt. Dies führt zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration.

Ebenfalls einen Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung von Calcium hat das cAMP-System. Sowohl Glucose (Grill et Cerasi, 1975) als auch die Sulfonylharnstoffe (Charles et al., 1976) führen zu einer Aktivierung des Adenylatcyclasesystems. Steigt cAMP intrazellulär dadurch an (Kuo et al., 1973) oder durch Hemmung der Phosphodiesterase (Ashcroft et al., 1972) oder durch beide Mechanismen, wird Calcium aus den Mitochondrien freigesetzt (Randle et al., 1968). So nimmt die Calciumkonzentration im Cytosol durch Gabe

von Methylxanthinen wie Theophyllin oder 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) zu, die über eine Hemmung der Phosphodiesterase zur Zunahme der cAMP-Konzentration führen (Hahn et al., 1979). Allerdings führt die Erhöhung des cAMP-Spiegels allein nicht zu einer Insulinsekretion (Malaisse, 1973; Lacy, 1975), der Glucose- oder Sulfonylharnstoff-Stimulus wird dadurch verstärkt. Fehlt ein solcher Stimulus, wird das aus den Mitochondrien freigesetzte Calcium durch gesteigerten Efflux aus der ß-Zelle sofort entfernt (Brisson et al., 1972). Neben diesen Depot-Organellen kommt den Insulingranula als intrazelluläre Calciumträger eine besondere Bedeutung zu: Nach erfolgtem Sekretionsstimulus und Steigerung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration kommt es zu einer Calciumkumulation in den Insulingranula (Bloom et al., 1977; Schäfer, 1980), bevor diese durch die Zellmembran ausgeschleust werden.

Über die unterschiedliche Bedeutung dieser beiden wohl wichtigsten intrazellulären Calciumpools, Mitochondrien und Granula, für die Insulinsekretion haben Hellman und Andersson (1978) berichtet: Phosphat steigert die Calciumaufnahme um ähnliche Mengen wie Glucose, allerdings führt Phosphat zu einer Hemmung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion. Werden nun die aufgenommenen Calciummengen getrennt betrachtet, so zeigt sich, daß Phosphat die Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien bewirkt, während durch Glucose aufgenommenes Calcium in den Insulingranula wiederzufinden ist. Da das durch Glucose aufgenommene Calcium zur Insulinsekretion führt, das durch Phosphat aufgenommene jedoch nicht, ja sogar die erstere hemmt, schließt Hellman, daß der "Mitochondrienpool" eine Art fest gebundenes Lagercalcium darstellt, während der "Granulapool" das auf Stimulationsreiz leicht mobilisierbare Aktionscalcium für den Stimulations-Se-

kretions-Prozeß darstellt.

C. Die Calciumabgabe aus der Zelle in den Extrazellulärraum

Ein Calciumefflux erfolgt entgegen dem Konzentrationsgradienten und ist somit als aktiver Transport anzusehen. Löffler und Kemmler fanden (1975) eine Calcium-aktivierbare ATP-ase in Inselzellmembranen von Ratten. Neben diesem sog. "frühen Efflux" durch die intakte Zellmembran kommt bei der aktivierten β-Zelle ein zweiter Ausstrom hinzu, der zeitlich mit der Insulinausschleusung zusammenfällt, der sog. "späte Efflux". Nach Steigerung der Glucosekonzentration auf stimulatorische Mengen (z.B. 16,7 mM) ist ein biphasischer Effekt zu beobachten: nach 60 Sekunden eine starke Abnahme des "frühen Effluxes", dem wenige Minuten später ein starker Anstieg folgt (Malaisse et al., 1973; Bukowiecki et Freinkel, 1976; Herchuelz et Malaisse, 1978).

Die Hemmung des frühen Effluxes wird von Formby und Mitarbeitern (1976) als eine energieabhängige Änderung der Zellmembranaffinität für Calcium erklärt. Darüberhinaus wäre denkbar, daß das zur Ausschleusung notwendige ATP in der durch Glucose aktivierten β-Zelle vorwiegend zur Bildung von cAMP in Anspruch genommen wird und somit als Energielieferant für den Calciumefflux ausfällt (Schäfer, 1980).

Der erste starke Abfall des Effluxes bleibt aber auch dann bestehen, wenn die Insulinsekretion gehemmt wird (Bukowiecki et Freinkel, 1976; Gylfe et Hellman, 1978; Herchuelz et Malaisse, 1978; Kikuchi et al., 1978). Dieser Effekt könnte von einer direkten Hemmung des Effluxes (Malaisse et al., 1973) herrühren, deren Ursache zeitlich vor dem Einfluß des Hemmstoffes liegt,

oder von einer gesteigerten Wiederaufnahme von ^{45}Calcium (Hellman, 1977). Gegen die Wiederaufnahme aus dem interstitiellen Raum spricht allerdings die Tatsache, daß der Abfall des Effluxes auch eintritt, wenn dem Perifusionsmedium 20 mM EGTA zugesetzt wird, das freigesetztes ^{45}Calcium sofort komplexiert und somit eine Wiederaufnahme ausschließt (Herchuelz et Malaisse, 1980).

Der folgende starke Anstieg des Calciumeffluxes ist möglicherweise auf das durch die Exocytose freigewordene Calcium aus den Insulinlagergranula zurückzuführen, den "späten Efflux" (Hellman et al., 1971; Malaisse et al., 1973). Dies ist zunächst einleuchtend, da unter physiologischen Calciumkonzentrationen im Medium dieser Efflux zeitlich mit der Exocytose zusammenfällt und auch anhält, solange die Insulinsekretion durch Glucose stimuliert wird. Wird Glucose dem Perifusat entzogen, ist parallel ein Abfall des Calciumeffluxes zu beobachten (Herchuelz et Malaisse, 1978). Dagegen sprechen allerdings Befunde, daß das Effluxschema nach Glucosereiz unverändert bleibt, selbst dann, wenn die Insulinsekretion gehemmt ist: z.B. durch Hunger (Gylfe et Hellman, 1978), L-Epinephrin Lernmark et Hellman, 1970), Somatostatin (Kikuchi et al., 1976). Auch Verapamil, in einer die Insulinsekretion hemmenden Konzentration, hat keinen Einfluß auf den zweiten Peak des Calciumeffluxes (Herchuelz et Malaisse, 1978). Somit kann der gesteigerte Efflux nicht allein dem Calcium aus Insulingranula zugeordnet werden. Gylfe und Hellman vermuten (1978), daß die Depolarisation der ß-Zellmembran, die am Beginn der Stimulations-Sekretions-Kette steht, direkt für den gesteigerten Calciumefflux mitverantwortlich ist.

Herchuelz und Malaisse (1978) ziehen daraus den Schluß, daß der Anstieg des Calciumeffluxes die Mengen der

Calciumaufnahme widerspiegelt und direkt mit ihr korreliert. Denn unter Bedingungen, unter denen die Calciumaufnahme gehemmt ist, wie höhere Konzentrationen an Verapamil (> 20 mM) oder hohe Magnesium-Konzentrationen im Medium - Magnesium verdrängt Calcium kompetitiv aus bestimmten Transportsystemen (Milner et Hales, 1967; Malaisse et al., 1976) - ist auch der späte Calciumefflux gehemmt (Herchuelz et Malaisse, 1978). Dies belegt auch die Korrelation der aufgenommenen Calciummengen mit der Höhe des Calciumeffluxes. Einen weiteren Hinweis liefert der Befund, daß Barium zwar zu einer Insulinsekretion führt, nicht aber zum Anstieg des Calciumeffluxes. Barium scheint in die β-Zelle aufgenommen zu werden, verdrängt Calcium aus intrazellulären Pools, wodurch die Calciumkonzentration im Cytoplasma ansteigt, was letztlich zur Insulinsekretion führt. Da aber keine Calciumaufnahme stattfand, entfiel auch der zweite Peak des Effluxes (Herchuelz et Malaisse, 1978).

Welcher der drei Wege die entscheidende physiologische Bedeutung für die Insulinsekretion hat, ist bisher nicht geklärt. Bei der Stimulation durch Glucose spielt die intrazelluläre Freisetzung und Rückspeicherung von Calcium durch Depotorganellen nicht die entscheidende Rolle. Die Funktion der β-Zelle ist abhängig von der Anwesenheit und Konzentration extrazellulären Calciums. Sie kann nicht - wie etwa die Skelettmuskelzelle - die für die Erregungsausbreitung notwendigen Calciummengen für eine gewisse Zeit ausschließlich aus intrazellulären Depots decken. Somit kommt dem cAMP-System wohl eine modulierende Bedeutung zu - wie Befunde mit Phosphodiesterasehemmstoffen zeigen -, während die entscheidende Calciumverschiebung aus der Regulation von Influx und Efflux zustande kommt.

1.1.2 Membranthiole und Insulinsekretion

Daß Thiolgruppen auf der Oberfläche sekretorischer Zellen oder Sekretionsgranula vorhanden sind und eine regulatorische Rolle bei der Freisetzung von Polypeptidhormonen spielen, belegen mehrere Arbeiten:

Bei der isolierten Neurohypophyse führen SH-Reagentien zur Freisetzung von Vasopressin (Douglas et al., 1965); bei der Adenohypophyse des Rindes führen SH-Reagentien in vitro zur Freisetzung von somatotropem Hormon (Schofield, 1971). An den isolierten Sekretionsgranula von Fischinseln fanden Watkins und Moore (1974) eine Steigerung der Insulinfreisetzung mit SH-Reagentien; genauso Hellman und Mitarbeiter (1973 und 1974) und Bloom und Mitarbeiter (1972) an der isolierten Pankreasinsel der Dickmaus. Schließlich fanden Erlichman und Mitarbeiter (1979) an Hamsterinsulinomzellen ebenfalls eine Steigerung der Insulinsekretion nach Gabe von SH-Reagentien. Die Hormonfreisetzung durch diese Stoffe ist abhängig vom Vorhandensein von Calcium im Inkubationsmedium (Bloom et al., 1972; Hellman et al., 1974; Erlichman et al., 1979). Die Insulinfreisetzung nach der Inkubation mit organischen Quecksilberverbindungen wie pCMB und CMBS konnten Erlichman und Mitarbeiter direkt mit einer gesteigerten Calciumaufnahme korrelieren.

Von Hellman und Mitarbeitern wurde (1974) postuliert, daß der Transport von Ionen in die Zelle im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von SH-Gruppen in der Cytoplasmamembran steht.

Folgende Möglichkeiten einer Beteiligung solcher Thiolgruppen am Sekretionsmechanismus für Insulin werden diskutiert:

1. "Glucoserezeptor" und Thiolgruppen

Nimmt man einen Rezeptor für Glucose an der β-Zelle an, so könnte nach Pagliara und Mitarbeitern (1975) Glucose die Insulinsekretion dadurch stimulieren, daß sie mit SH-Gruppen an der Membran reagiert, die in Verbindung mit dem postulierten Rezeptor stehen. Auch die Arbeiten mit SH-Reagentien zeigen, daß Membranthiolgruppen, wenn sie mit benachbarten Thiolgruppen zu Disulfidbrücken oxidiert werden, z.B. durch die Disulfide DTMB und CPDS (Grasetti, 1969 sowie Grasetti et Murray, 1970) eine Insulinsekretion induzieren. Stoffe wie CMBS oder pCMB, die mit SH-Gruppen zu Mercaptiden reagieren, führen ebenfalls zur Insulinsekretion (Hellman et al., 1974; Bloom et al., 1972; Ammon et al., 1977; Erlichman et al., 1979). Diese Fähigkeit hängt nicht von einem gesteigerten Glucoseabbau ab, da die Effekte bei 3 und 17 mM Glucose gleichermaßen sichtbar werden und die Menge an $^{14}CO_2$ aus D-U-^{14}C-Glucose gleich bleibt (Hellman et al., 1974; Erlichman et al., 1979). Auch Alkylantien wie Jodacetamid stimulieren zunächst die Insulinsekretion, führen aber danach zu einer Hemmung, was Hellman und Mitarbeiter (1974) der Tatsache zuschreiben, daß solche Stoffe in die β-Zelle eindringen und dort die Glucoseoxidation hemmen, so daß es zu einem Abfall an Substrat kommt.

2. Glucosemetabolismus und Thiolgruppen

Denkt man an die Glucose als wichtigsten physiologischen Stimulus und an die Tatsache, daß für die Sekretion von Insulin auf Glucosereiz ein Glucosestoffwechsel stattfinden muß (Matschinsky et Ellermann, 1968), so muß die Frage nach dem physiologischen Zusammenhang zwischen Glucosemetabolismus und Thiolgruppen der Membran gestellt werden.

Aus dem Stoffwechsel stammt zunächst die Energie für die Exocytose. Stoffe wie Tolbutamid, die die Insulinsekretion potenzieren, aber selbst nicht verstoffwechselt werden, verlieren ohne Glucosezusatz ihre Stimulationsfähigkeit (Ammon, 1973). Darüberhinaus stellt der Glucoseabbau reduzierte Pyridinnukleotide zur Verfügung. Eine Steigerung der reduzierten Pyridinnukleotide geht mit der Insulinsekretion einher, die auf Glucosereiz oder α-Ketoisocapronsäurereiz oder nach L-Leucin-Gabe stattfindet (Panten et al., 1973 et 1974). Wird die Insulinsekretion durch Hemmstoffe wie Menadion (Malaisse et al., 1978 a), NH_4^+ (Sener et al., 1978 a) und Methylenblau (Ammon et al., 1977) gehemmt, sinkt auch die Konzentration der reduzierten Pyridinnukleotide. Um nun die intrazelluläre Verteilung dieser Pyridinnukleotide und ihre Trennung in NADPH/NADP- und NADH/NAD-Anteile zu ermöglichen, wurde sowohl die Substratmenge als auch das entstandene Produkt einer pyridinnukleotidkatalysierten Dehydrogenase bestimmt und die jeweiligen Pyridinnukleotidquotienten berechnet (nach Veech et al., 1969). Dabei wurde festgestellt, daß die freie cytosolische NADPH/NADP-Ratio nach Steigerung der Glucosekonzentration von 2 auf 20 mM wesentlich mehr anstieg als das Gesamtnukleotidverhältnis. Daraus läßt sich eine wichtige Rolle dieses Redoxpaares NADPH/NADP für die glucoseinduzierte Insulinsekretion herleiten (Ammon et Verspohl, 1976; Sener et al., 1978 b; Malaisse et al., 1979; Ashcroft, Rev. 1980).

Das NADPH wird beim Abbau der Glucose im Pentosephosphatshunt gebildet. Daraus schließen Verspohl und Mitarbeiter (1979), daß dem Glucosemetabolismus über diesen Stoffwechselweg eine entscheidende Rolle am Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion zukommt, da die Aktivität des PPS bei Steigerung der

Glucosekonzentration zunimmt.

Folgendes Modell nach Ashcroft (1980) veranschaulicht die Stoffwechselereignisse, die zum "stimulus-secretion coupling" in der β-Zelle führen:

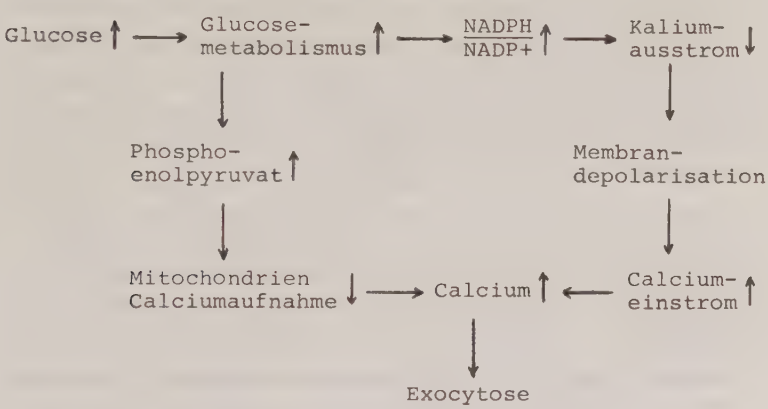


Abb.1: Schematische Darstellung der möglichen regulatorischen Ereignisse bei der durch Glucose induzierten Insulinsekretion. Nach Ashcroft (1980) führt die Steigerung der Glucosekonzentration über zwei Wege zur Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration: 1. über die Steigerung des Phosphoenolpyruvats und Hemmung der Calciumaufnahme in die Mitochondrien und 2. über eine vermehrte Calciumaufnahme durch die Cytoplasmamembran nach deren Depolarisation. Die Folge der gesteigerten Calciumkonzentration im Plasma ist die Exocytose.

3. Glutathionsystem und Thiolgruppen

Ammon und Mitarbeiter stellten (1977) die Beziehung des NADPH/NADP-Quotienten zum intrazellulären Glutathionsystem her:

Die Bedeutung des NADPH liegt unter anderem in der Aufrechterhaltung eines gewissen Redoxstatus in der Zelle. Dabei steht das NADPH/NADP-Paar mit dem Redoxsystem GSH/GSSG in Verbindung. NADPH ist ein wichtiges Cosubstrat für die Glutathionreduktase zur enzymatischen Reduktion von GSSG zu GSH. Ferner konnte an verschiedenen Organen gezeigt werden, daß der intrazelluläre GSH/GSSG-Quotient den Redoxstatus von Thiolgruppen in der Membran beeinflussen kann (Rink, 1974).

Auf eine Beteiligung des GSH/GSSG-Quotienten am Mechanismus der Insulinsekretion schließen Ammon und Mitarbeiter (1979) auf Grund folgender Befunde:

Glucose führt zu einem Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten. Methylenblau senkt den Quotienten dosisabhängig. Diamid, eine Substanz, von der bekannt ist, daß sie GSH oxidiert und damit dessen Konzentration in Geweben vermindert, setzt den GSH/GSSG-Quotienten in Inseln herab und hemmt die durch Glucose oder durch Glucose plus pCMB, Glucose plus Tolbutamid oder Arginin oder Leucin hervorgerufene Insulinsekretion.

Exogenes Insulin senkt den NADPH/NADP-Quotienten (Ammon et Verspohl, 1976) und hemmt die durch Glucose oder durch Glucose plus pCMB und Glucose plus Tolbutamid induzierte Insulinsekretion (Ammon et al., 1980). Auch die durch Glucose plus Arginin und Glucose plus Leucin gesteigerte Insulinsekretion wird durch exogenes Insulin gehemmt (an der isolierten Insel: Händel, 1978; am isolierten Rattenpankreas: Verspohl et al., 1981). Darüberhinaus senkt exogenes Insulin auch die intrazellulären GSH-Werte isolierter Langer-

hansscher Inseln bei 5,6 und 16,7 mM Glucose im Medium (Ammon et al., 1980).

Tertiäres Butylhydroperoxid, eine Substanz, die als Substrat der Glutathionperoxidase wirkt und die damit auf indirektem Wege zur Senkung des intrazellulären GSH-Spiegels führt, erniedrigt den GSH/GSSG-Quotienten und die durch Glucose oder durch Glucose plus pCMB, Glucose plus Tolbutamid oder Arginin oder Leucin induzierte Insulinsekretion (Ammon et al., 1979).

Die verminderte Insulinsekretion bei alten Ratten geht mit einer Abnahme des GSH/GSSG-Quotienten einher (Eujen, 1979).

Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid), ebenfalls ein Azoester mit gleichem Wirkungsmechanismus wie Diamid, senkt den insulären GSH/GSSG-Quotienten und die durch Glucose induzierte Insulinsekretion. Sein Salz, das die Plasmamembran nicht permeiert, führt dagegen zu einer Insulinsekretion (Eujen, 1979).

Wie auch immer die Diskussion um die Rezeptor- bzw. Metabolismustheorie ausgeht, scheint nach den Beobachtungen in unserem Arbeitskreis dem Redoxstatus des NADPH/NADP-Systems folgende Bedeutung für die Insulinsekretion zuzukommen, wie sie die Abbildung 2 veranschaulicht.

Ob ein Stimulus der Insulinsekretion wie Glucose, Tolbutamid oder p-Chlormercuribenzoat wirksam wird, hängt davon ab, ob Membranthiole in einem oxidierten oder einem reduzierten Zustand vorliegen, das heißt: Sind die Membranthiole oxidiert, so werden Stimuli nicht wirksam, sind sie reduziert, so werden sie wirksam. Kontrolliert wird der Redoxzustand dieser Membranthiole durch den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten und den NADPH/NADP-Quotienten. Diese

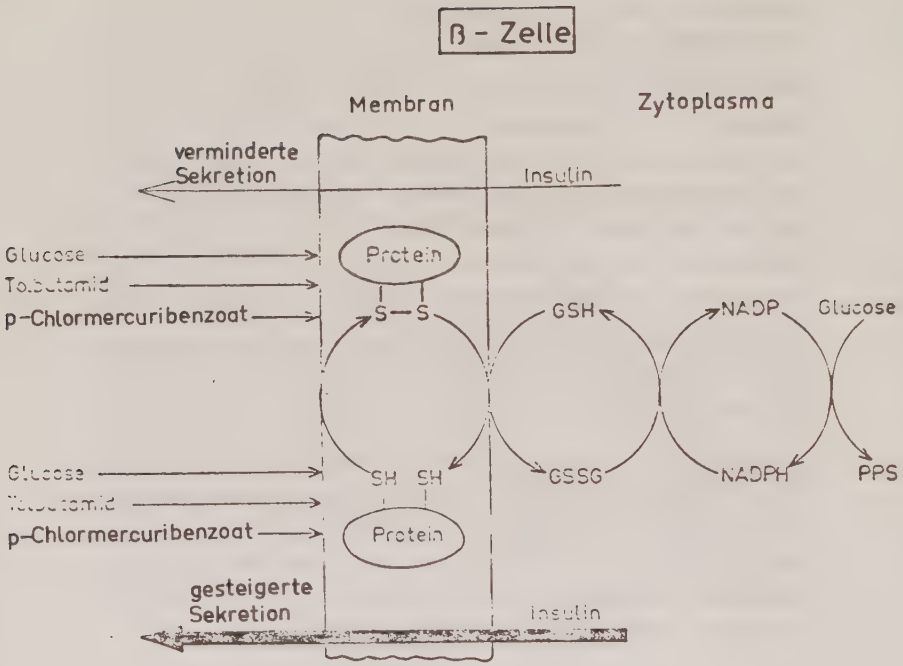


Abb. 2: Modell zur Rolle des Redoxstatus von Membranthiolen bei der Regulation der Insulinsekretion.
In diesem Schema wirken Glucose, Tolbutamid und p-CMB als Sekretionsstimuli auf die β-Zellmembran. Sind die Membranthiole, die möglicherweise am Stimulations-Sekretionsprozeß beteiligt sind, in reduziertem Zustand, führen Stimuli zu einer gesteigerten Insulinsekretionsantwort. Liegen sie oxidiert vor, ist der Stimulationseffekt vermindert. Dieser Redoxstatus wird möglicherweise durch folgende intrazelluläre Reaktionskette aufrechterhalten: Glucoseoxidation über den Pentosephosphat Shunt → NADPH → GSH → Reduzierte Membranthiole.
(aus: Ammon et al., 1980)

Quotienten werden ihrerseits durch Glucose und Insulin beeinflußt (Ammon et al., 1980).

1.2 Fragestellung

1.) In der vorliegenden Arbeit sollte in erster Linie eine Methode zur Calciumbestimmung in isolierten Langerhansschen Inseln von Ratten aufgestellt werden, mit der verschiedene nachfolgende Fragestellungen bearbeitet und beantwortet werden können.

Dazu wurde aus der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Methoden diejenige ausgearbeitet und modifiziert, die mit möglichst wenig technischem und apparativem Aufwand den Calciumgehalt der Insel bestimmt, der für die zu untersuchenden Fragestellungen eine ausreichend exakte und aussagekräftige Größe darstellt.

Aufgrund dieser Voraussetzungen wurde die von Hellman (1978) und Hellman und Mitarbeitern (1976) aufgestellte Methode zur Bestimmung des Lanthan-non-displaceable-^{45}Calciums der Arbeit zugrunde gelegt.

2.) Mit der entwickelten Methode sollte nun der Frage nachgegangen werden, inwieweit Redoxverschiebungen des intrazellulären Glutathionsystems durch pharmakologische Hilfsstoffe zu einer Veränderung der durch Glucose induzierten Calciumaufnahme führen. Es wurde die gesteigerte Calciumaufnahme unter einer die Insulinsekretion stimulierenden Glucosekonzentration gemessen und der Calciummenge gegenübergestellt, die nach Zugabe von Thioloxidantien, welche die Zellmembran rasch permeieren und intrazellulär Glutathion oxidieren, zu messen war (Diamid, tert. Butylhydroperoxid).

3.) In einem weiteren Schritt sollte der Zusammenhang zwischen intrazellulärem Glutathionsystem, membranständigen Thiolen und der glucoseinduzierten Calciumaufnahme hergestellt werden. Dazu wurde ein besonders geeigneter pharmakologischer Hilfsstoff eingesetzt, mit dem Kosower und Mitarbeiter (1974) an roten Blutzellen gearbeitet haben: Diazodicarbonsäure-N'-methylpiperazid (DIP). Dieses Thioloxidans ist leicht membrangängig und oxidiert Glutathion in isolierten Langerhansschen Inseln von Ratten zu GSSG (Eujen, 1979). Wird diese Verbindung jedoch mit Methyljodid quarternisiert und so in sein Salz übergeführt, verliert es aufgrund seiner Polarität die Membrangängigkeit und kann nur noch extrazellulär erreichbare Thiole oxidieren. Der unterschiedliche Einfluß dieser beiden Stoffe auf die basale und die durch Glucose stimulierte Calciumaufnahme wurde untersucht.

4.) Darüberhinaus wurde durch den Einsatz beider Stoffe in Kombination untersucht, inwieweit eine Verminderung des intrazellulären Glutathions durch DIP Effekte des DIP-Salzes dadurch hemmt, daß Glutathion keine Redoxäquivalente mehr an die Membran abgeben kann, um Membranthiolgruppen in reduziertem Zustand zu halten oder Disulfidbrücken zu reduzieren.

2. M A T E R I A L

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet, die Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe, und Trinkwasser ad libitum erhielten. Das Körpergewicht der Tiere betrug zwischen 200 und 350 g. Die Haltung erfolgte in einem licht- und temperaturkontrollierten (24°C) Raum. Die Tiere hatten ein Alter zwischen drei und fünf Monaten.

2.2 Geräte

Stereomikroskop Nikon SM 6
Schüttelwasserbad, Firma Köttermann
Packard TRI CARB Liquid Scintillation Spectrometer
Mod. 3385
Beckmann pH-Meter H 5
Olivetti Tischcomputer P 602
Polystyrolröhrchen Firma Greiner, Nürtingen
Nylonnetze, Fadendicke ca. 50 µm,
Maschenweite 54 µm,
Firma Maierthaler, Köln
Plexiglashaube zur Begasung der Proben,
Eigenbau
Ultraschallbad Econoclean
Gamma-Zähler Nuclear Chicago

2.3 Chemikalien und Enzyme

2.3.1 Bezogene Chemikalien und Enzyme

Collagenase (126 - 196 µE/mg)	Worthington Biochem. Corp. Freehold, USA
α-D-Glucose	Serva Heidelberg
Rinderserumalbumin	Behringwerke Marburg
tert. Butylhydroperoxid	Merck-Schuchardt, München
Diamid (Diazodiameisensäure-bis-N-N-dimethylamid)	synthetisiert von Dr. Vitzthum, HAG AG, Bremen
Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan crist.	Boehringer Mannheim
Hyaminhydroxid	New England Nuclear, Boston, USA
Unisolve I	Zinsser, Frankfurt 50
^{45}Calcium	Amersham-Buchler, Braunschweig
^{125}J-Insulin	Isotopendienst West, Sprendlingen
Insulin Radioimmunassay Kit INSIK^{R}	Isotopendienst West, Sprendlingen
Ratteninsulin	Novo Lab., Kopenhagen
Insulinantikörper	Novo Lab., Kopenhagen

Alle anderen, nicht genannten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

2.3.2 Eigensynthetisierte Stoffe

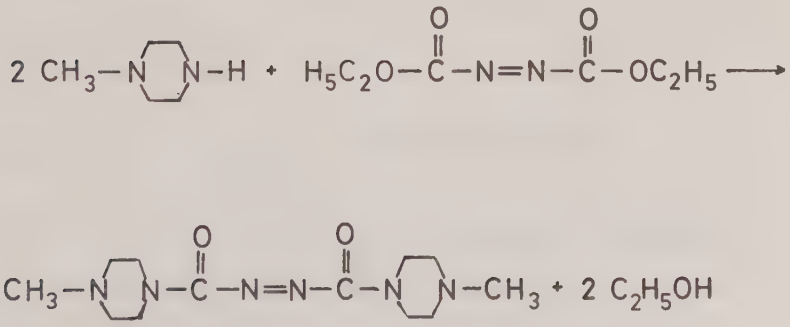
Synthese der DIP-Verbindungen:

Die DIP-Verbindungen wurden in Anlehnung an die Methode von Kosower und Mitarbeitern (1974) synthetisiert.

Synthese von DIP

22,75 g N-Methylpiperazin (1 Äquivalent, leichter Überschuß) wurde unter Rühren bei 2°C langsam zu einer Lösung von 18,9 g (0,5 Äquivalente) Azodicarbonsäurediäthylester in Petroläther/Äther 3:1 getropft. Nach 2-stündigem Rühren wurde der entstandene gelbe Niederschlag abfiltriert, mit absolutem Äther nachgewaschen und aus n-Hexan/Benzol umkristallisiert.
Schmelzpunkt: 142°C

Reaktionsverlauf:



IR-Spektrum von DIP

Das Infrarotspektrum von DIP zeigt Banden im Bereich von 2980 cm^{-1} bis 2880 cm^{-1}, sowie zwischen 1470 cm^{-1} und 1440 cm^{-1}, die den CH_2-Valenzschwingungen bzw. den CH_2- und CH_3-Deformationsschwingungen zugeordnet werden können. Die Bande bei 2830 cm^{-1} ist charakteris-

tisch für tertiäre Amine, die Carbonylbande erscheint bei 1710 cm^{-1}.

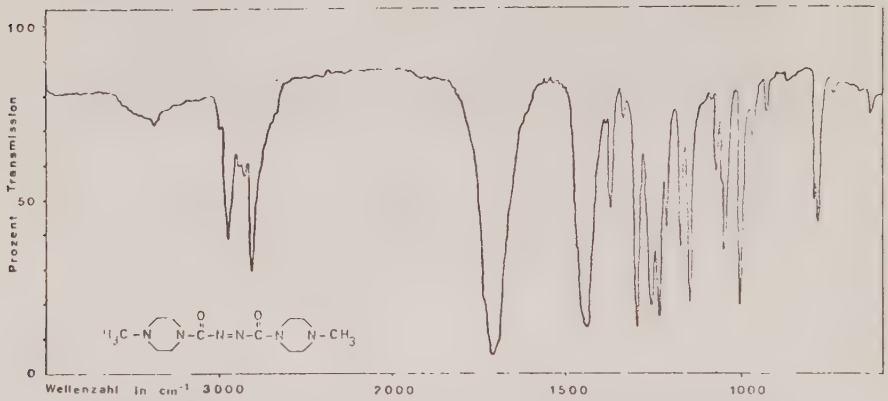


Abb. 3: IR-Spektrum von DIP

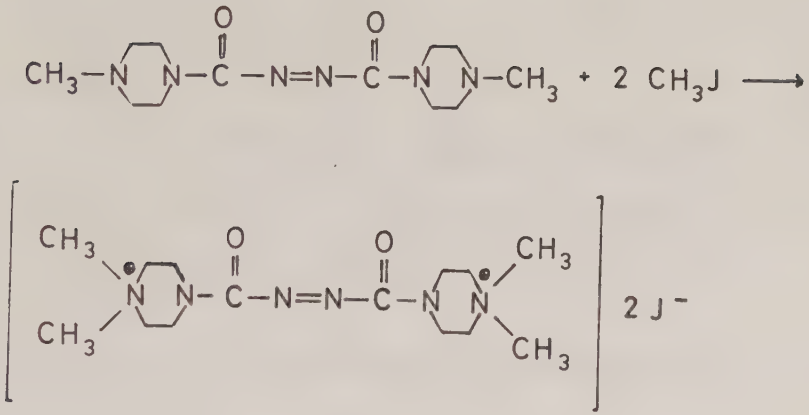
Synthese von DIP-Salz

3,75 g (1 Äquivalent) DIP und 15 g (4 Äquivalente) Methyljodid als Quarternisierungsmittel wurden für sich im doppelten Volumen Acetonitril gelöst. Die Lösungen wurden vereinigt, eine Stunde stehen gelassen und anschließend noch 30 Minuten unter Rückfluß auf dem Wasserbad erwärmt. Das quartäre Salz schied sich direkt ab und wurde abgesaugt.

Zur Reinigung wurde das Reaktionsprodukt in möglichst wenig Wasser gelöst und in 99 %igem Äthanol wieder ausgefällt.

Schmelzpunkt: 262°C

Reaktionsverlauf:



IR-Spektrum von DIP-Salz

Die Banden zwischen 3040 cm^{-1} und 2900 cm^{-1} können den CH_2- und CH_3-Valenzschwingungen zugeordnet werden, bei 1710 cm^{-1} erscheint die Carbonylgruppe. Die bei DIP vorhandene ($N-CH_2$)-Bande, charakteristisch für tertiäre Amine, tritt beim DIP-Salz nicht mehr auf. Daraus darf geschlossen werden, daß die Salzbildung am basischen Piperazinstickstoff stattgefunden hat.

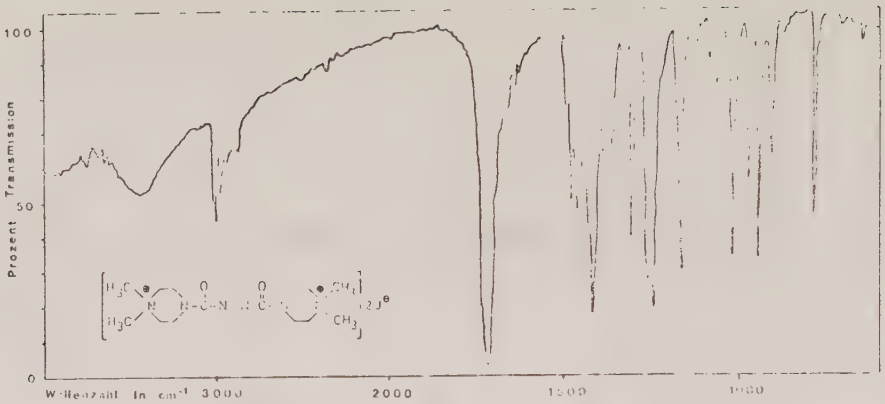
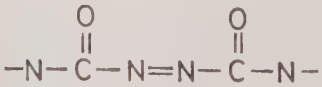


Abb. 4: IR-Spektrum von DIP-Salz

Verhalten der DIP-Verbindungen im Inkubationsmedium

Bezüglich der Stabilität der DIP-Verbindungen im wässrigen Medium haben Untersuchungen von Eujen (1979) gezeigt, daß bei den hier verwendeten Inkubationszeiten die Stabilität gewährleistet ist.

Weitere Untersuchungen sollten nun zeigen, ob unter physiologischem pH von 7,35 eine Wechselwirkung der DIP-Verbindungen mit dem Calcium im Medium stattfindet. Denkbar wäre eine Komplexbildung des Calciums an der



Struktur, was bei einer Konzentration des Hemmstoffs von 0,025 mM bis 0,1 mM und einer Calciumkonzentration von 2,6 mM zu einer quantitativen Komplexierung des Hemmstoffes führen würde.

Dazu wurden folgende Elektronenspektren erstellt:

1. DIP, in einer Konzentration von 0,2 mM in Wasser, gemessen gegen Wasser von 400 bis 250 nm (Abb. 5)
2. DIP, in einer Konzentration von 0,2 mM in Wasser, mit Ca^{2+}, in einer Konzentration von 2,6 mM in Wasser, gemessen gegen Wasser von 400 bis 250 nm (Abb. 6)
3. DIP^{2+}, in einer Konzentration von 0,2 mM in Wasser, gemessen gegen Wasser von 400 bis 250 nm (Abb. 7)
4. DIP^{2+}, in einer Konzentration von 0,2 mM in Wasser, mit Ca^{2+}, in einer Konzentration von 2,6 mM in Wasser, gemessen gegen Wasser von 400 bis 250 nm (Abb. 8)
5. DIP, in einer Konzentration von 0,2 mM in Wasser, gemessen gegen DIP, in einer Konzentration von 0,2 mM in Wasser, mit Ca^{2+}, in einer Konzentration von 2,6 mM in Wasser, von 400 bis 250 nm (Abb. 9)
6. DIP^{2+}, in einer Konzentration von 0,2 mM in Wasser, gemessen gegen DIP^{2+}, in einer Konzentration von 0,2 mM in Wasser, mit Ca^{2+}, in einer Konzentration von 2,6 mM in Wasser, von 400 bis 250 nm (Abb. 10)

Die Auswertung dieser Spektren ergab folgendes:

DIP zeigt ein Maximum bei 295 nm. DIP-Salz zeigt ein Maximum bei 295 nm und ein zweites bei 289 nm.

Nach Zusatz der Calciumionen verändern sich beide Spektren nicht, es tritt weder eine Verschiebung der Maxima ein, noch treten weitere Maxima auf.

Bei der Messung der DIP-Salzlösung gegen die DIP-Salz-Calciumlösung und DIP gegen DIP-Calcium-Lösung zeigt sich kein Absorptionsmaximum.

Daraus ist zu schließen, daß unter den Versuchsbedin-

Abb. 5

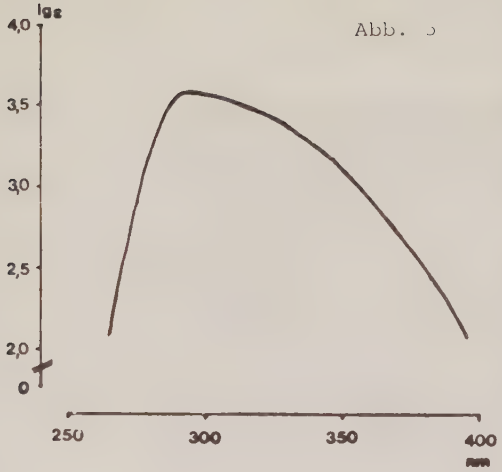


Abb. 6

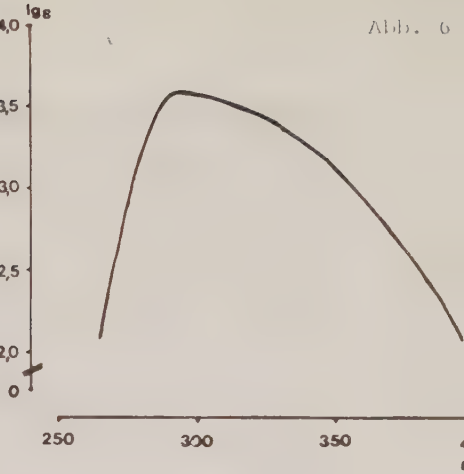


Abb. 7

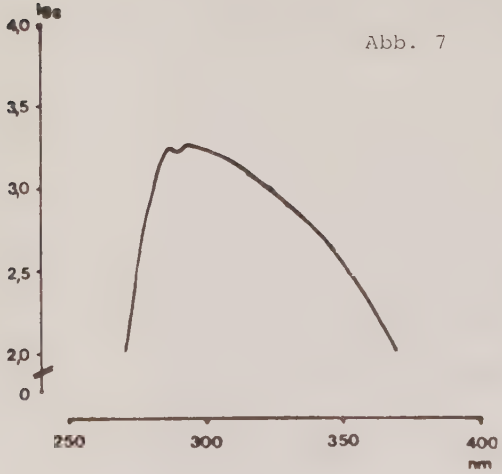


Abb. 8

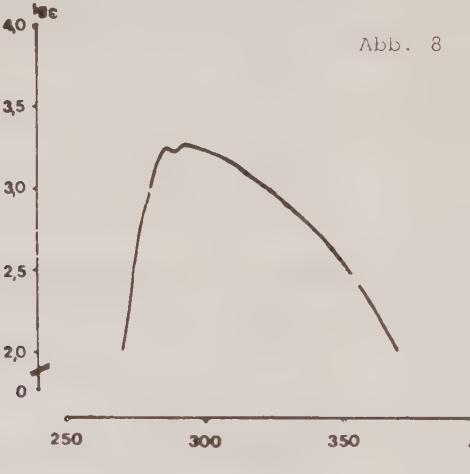


Abb. 9

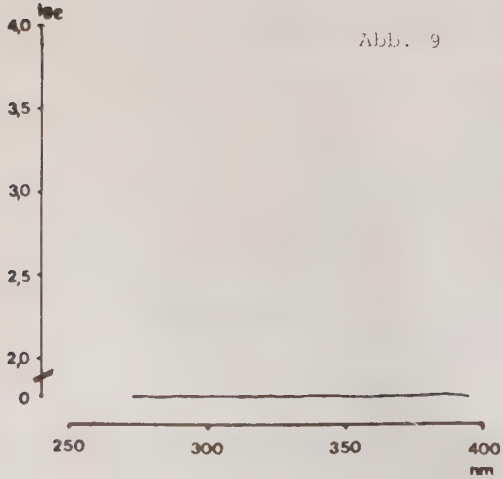
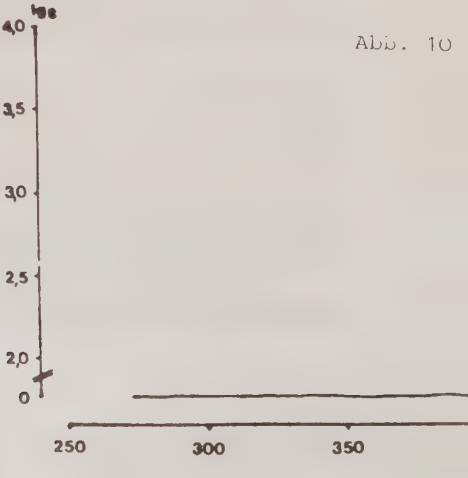


Abb. 10

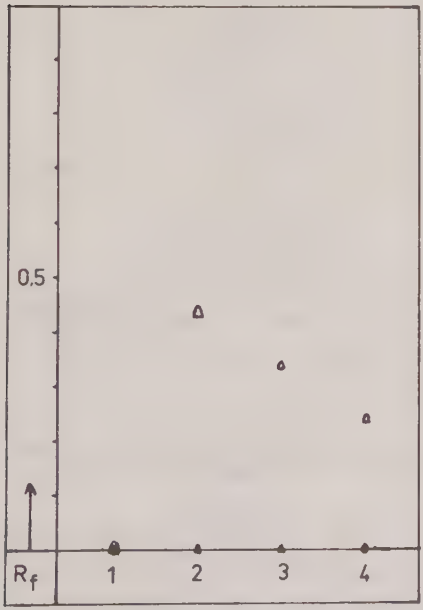


gungen keine Wechselwirkung zwischen DIP bzw. DIP-Salz und Calcium im Medium besteht.

Haltbarkeit der DIP-Verbindungen

Die hergestellten DIP-Verbindungen wurden während der Versuchsserien trocken und unter Lichtabschluß aufbewahrt, um einer möglichen Zersetzung entgegen zu wirken. In regelmäßigen Abständen wurden Dünnschichtchromatogramme erstellt, um die chromatographische Reinheit festzustellen.

Während der ganzen Versuchszeit zeigten sich keine Veränderungen im DC-Bild.



1. Azodicarbonsäure-diethylester
   R_f: -
   sitzt am Start
2. Methylpiperazin
   R_f: 0,430
3. DIP
   R_f: 0,345
4. DIP-Salz
   R_f: 0,235

Abb. 11

Stationäre Phase: Kieselgel GF_{254} Merck
Fließmittel : Butanol : Wasser : Ammoniak
85 : 10 : 5 bei Kammersättigung
Laufzeit : ca. 110 Minuten
Detektion : Fluoreszenzlöschung bei 254 nm
Eigenfarbe der DIP-Verbindungen

2.4 Elektrolytlösungen

2.4.1 Hanks' Lösung
(Hanks und Wallace, 1949)

Stammlösung:

NaCl	80,00 g
KCl	4,00 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,60 g
KH_2PO_4	0,60 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,00 g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	1,85 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Vor Gebrauch wurde diese Stammlösung mit destilliertem Wasser 1 + 9 verdünnt, mit 3 mM Glucose versetzt und mit $NaHCO_3$-Lösung auf pH 7,35 eingestellt.

2.4.2 Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRB-Lösung)

Die verwendete KRB-Lösung setzt sich nach der Originalbeschreibung von Umbreit und Mitarbeitern (1972) folgendermaßen zusammen:

NaCl-Lösung	0,90 % = 154 mM	100 Teile
KCl-Lösung	1,15 % = 154 mM	4 Teile
$CaCl_2$-Lösung	1,22 % = 110 mM	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	2,11 % = 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$-Lösung	3,82 % = 154 mM	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	1,30 % = 154 mM	21 Teile

Um diese Lösung jederzeit frisch bereiten zu können, erwies es sich als praktisch, drei voneinander getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung herzustellen:

Lösung A:

NaCl	69,20 g
KCl	3,61 g
KH_2PO_4	1,62 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,93 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Lösung B:

$NaHCO_3$	21,10 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Lösung C:

$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	3,73 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

Zum Gebrauch stellte man folgende Mischung her:

Lösung A	1 Teil
Lösung B	1 Teil
Lösung C	1 Teil
Aqua bidest.	7 Teile

Diese KRB-Lösung wurde 60 Minuten mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) begast. Dann erfolgte Zugabe von

2 % Rinderserumalbumin und Einstellung des pH auf 7,35. Damit stand die KRB-Lösung für die Vorinkubation zur Verfügung.

2.4.3 Tris-Puffer
(nach Hellman, 1978)

2.4.3.1 Tris-Puffer mit physiologischer Calciumkonzentration

Tris	5,0 mM	≙	605,5 mg/l Medium
NaCl	139,0 mM	≙	8132,0 mg/l Medium
KCl	4,7 mM	≙	350,2 mg/l Medium
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	2,6 mM	≙	382,0 mg/l Medium
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	1,2 mM	≙	243,6 mg/l Medium

Die Lösung wurde vor der Inkubation mit Carbogen begast, die dem Inkubationsschema entsprechenden Zusätze beigegeben und mit HCl auf pH 7,35 eingestellt.

2.4.3.2 Tris-Puffer mit verminderter Calciumkonzentration

Gleiche Zusammensetzung wie 2.4.3.1, jedoch die Calciumkonzentration auf 0,04 mM gesenkt, die Ionenstärke mit Natriumchlorid ausgeglichen.

2.5 Inkubationsmedien

2.5.1 Medien für die Versuche 4.1 bis 4.3

Es wurde für diese Versuche zunächst der Tris-Puffer mit verminderter Calciumkonzentration zugrunde gelegt, der nachfolgend genannte Zusätze enthielt. Bei dieser geringen Gesamtcalciumkonzentration wird durch die Markierung mit ^{45}Calcium für die Hauptinkubation eine spezifische Aktivität von 440 Ci/mol erreicht. Das hat den Vorteil, daß nahezu das gesamte Calcium im Medium aus ^{45}Calcium besteht und Änderungen in der Calciumaufnahme besser meßbar sind. Hellman und Mitarbeiter haben (1977) gezeigt, daß eine Steigerung der Glucosekonzentration von 3 mM auf 20 mM zu einer signifikanten Steigerung der Calciumaufnahme in den Lanthan-non-displaceable Pool Langerhansscher Inseln führt, und zwar bei Calciumkonzentrationen von 0,016 mM bis 2,6 mM im Inkubationsmedium.

Medium I:

Glucosekonzentration 3 mM ≙ 0,54 mg/ml
Calcium nicht radioaktiv markiert, für die Kurzspülinkubation.

Medium II a:

Glucosekonzentration 3 mM ≙ 0,54 mg/ml
Radioaktiv markiertes Calcium, spezifische Aktivität 440 Ci/mol für die Hauptinkubation.

Medium II b:

Glucosekonzentration 20 mM ≙ 3,6 mg/ml
Radioaktiv markiertes Calcium, spezifische Aktivität 440 Ci/mol für die Hauptinkubation.

Den Hauptinkubationsmedien wurden die verwendeten Hemmstoffe wie folgt zugesetzt:

t-BHP : 180,2 µg/ml Medium II b (2 mM)
Diamid: 17,2 µg/ml Medium II b (0,1 mM)

Medium III:

$LaCl_3$-Zusatz, in einer Konzentration von 2 mM
≙ 490,0 mg/ml
Calcium, nicht radioaktiv markiert, für die Lanthanfixierinkubation. Dieses Medium wird nicht begast, die pH-Einstellung erfolgt mit HCl und NaOH.

2.5.2 Medien für den Versuch 4.4

Da die Medien mit verminderter Calciumkonzentration bis Versuch 4.3 eine unphysiologische Situation für die Inseln darstellen und der Insulinsekretionsprozeß bei so geringen Calciummengen im Medium kaum meßbar sein dürfte, wurde für den Insulinsekretionsversuch der Tris-Puffer mit 2,6 mM Calcium gewählt.

Medium I:

Entfällt, da ab Versuch 4.4 die Kurzspülinkubation mit Medium III durchgeführt wurde.

Medium II a:

Glucosekonzentration 3 mM ≙ 0,54 mg/ml
Calcium, nicht radioaktiv markiert, für die Hauptinkubation.

Medium II b:

Glucosekonzentration 20 mM ≙ 3,6 mg/ml
Calcium, nicht radioaktiv markiert, für die Hauptinkubation.

Medium III:

$LaCl_3$-Zusatz, in einer Konzentration von 2 mM
≙ 490,0 mg/ml
Calcium, nicht radioaktiv markiert, für die Lanthanfixierinkubation. Dieses Medium wird nicht begast, die pH-Einstellung erfolgt mit HCl und NaOH.

2.5.3 Medien ab Versuch 4.5

Es wurde in diesen Versuchen weiterhin mit Tris-Puffer und physiologischer Calciumkonzentration gearbeitet. Dadurch sinkt bei der Markierung mit ^{45}Calcium die spezifische Aktivität auf 7,8 Ci/mol. Die absolute Menge an aufgenommenem radioaktiven Calcium wird bei diesen Versuchen dadurch niedriger, daß der Anteil an ^{45}Calcium am Gesamtcalcium im Medium nur noch einen Bruchteil ausmacht. Auf der anderen Seite dürfte der Insulinsekretionsprozeß und der Calciumaufnahmeprozeß unter physiologischen Calciumkonzentrationen in vollem Ausmaße ablaufen.

Medium II a:

Glucosekonzentration 3 mM ≙ 0,54 mg/ml
Radioaktiv markiertes Calcium, spezifische Aktivität 7,8 Ci/mol, für die Hauptinkubation.

Medium II b:

Glucosekonzentration 20 mM ≙ 3,6 mg/ml
Radioaktiv markiertes Calcium, spezifische Aktivität 7,8 Ci/mol, für die Hauptinkubation.

Diesen Medien wurden die Zusätze entsprechend nachfolgender Aufstellung zugesetzt:

DIP:	7,05 µg/ml	Medium II a	(0,025 mM)
	14,10 µg/ml	Medium II a	(0,05 mM)
	28,20 µg/ml	Medium II a	(0,1 mM)
DIP:	7,05 µg/ml	Medium II b	(0,025 mM)
	14,10 µg/ml	Medium II b	(0,05 mM)
	28,20 µg/ml	Medium II b	(0,1 mM)
DIP^{2+}:	14,15 µg/ml	Medium II a	(0,025 mM)
	28,30 µg/ml	Medium II a	(0,05 mM)
	56,60 µg/ml	Medium II a	(0,1 mM)
DIP^{2+}:	14,15 µg/ml	Medium II b	(0,025 mM)
	28,30 µg/ml	Medium II b	(0,05 mM)
	56,60 µg/ml	Medium II b	(0,1 mM)

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Aufstellung einer modifizierten Methode zur Bestimmung des aufgenommenen Calciums in Langerhansschen Inseln.

Es wurden verschieden Methoden beschrieben, um Veränderungen der Calciumfluxe und somit Veränderungen des intrazellulären Calciumspiegels zu messen.

Malaisse und Mitarbeiter bestimmten (1978 b) den ^{40}Calciumgehalt Langerhanscher Inseln mit der Atomabsorptionsmethode.

Schäfer und Klöppel (1974 b) beschrieben die Pyroantimonattechnik, kombiniert mit einer Röntgenmikroanalyse (X-ray), mit deren Hilfe auch die subzelluläre Lokalisation von Calciumionen zu bestimmen ist.

Eine weitere Möglichkeit Calciumfluxe zu verfolgen, ist die Bestimmung von radioaktiv markiertem ^{45}Calcium (Malaisse-Lagae et Malaisse, 1971; Hellman et al., 1971). Man tauscht soviel stabiles Calcium im Medium durch ^{45}Calcium aus, daß nach Inkubation der Inseln der ^{45}Calciumgehalt der Inseln zu bestimmen ist. Vorausgesetzt, daß sich durch laufenden Austausch von Calcium von extra- nach intrazellulär in der Zelle dieselbe spezifische Aktivität einstellt, wie sie im Medium herrscht, und vorausgesetzt, daß die Kinetik des ^{45}Calciums sich nicht von der des ^{40}Calciums unterscheidet, kann die Bestimmung des ^{45}Calciums als repräsentativer Wert für die tatsächliche Menge an Gesamtcalcium angesehen werden.

Für die gegebene Aufgabenstellung und aufgrund der vorhandenen technischen Möglichkeiten bot sich die Bestimmung durch radioaktives Calcium an.

Ziel nachfolgender Versuche war es, eine Methode aufzustellen, mit der der Gehalt an ^{45}Calcium der Langerhansschen Inseln nach der Hauptinkubation mit ihren verschiedenen Bedingungen möglichst exakt zu bestimmen war.

Dabei mußten zwei Fehlerquellen ausgeschaltet werden:

1. Mitbestimmen von passiv anhaftendem, nicht in die Zelle aufgenommenem Calcium (sog. extracellular space)
2. Verlust an intrazellulärem Calcium durch unerwünschten Efflux während des Waschvorgangs.

Hellman und Mitarbeiter beschrieben (1976) die Lanthanmethode an Calciumaufnahmestudien in Langerhansschen Inseln der Dickmaus. Diese Methode geht auf van Breemen und Mitarbeiter zurück, die (1972) Lanthan^{3+} benutzten, um extrazelluläres Calcium zu verdrängen und den transmembranen Calciumflux bei glatten Muskelfasern, die mit ^{45}Calcium vorgeladen wurden, zu blokkieren. Diese Methode wurde (1974) von Chandler und Williams für Experimente mit Pankreasfragmenten der Maus beschrieben.

Da das Calciumion die Eigenschaft hat, sich unspezifisch an organische Moleküle zu binden, ist es schwierig, bei Aufnahmestudien zu differenzieren, ob es sich bei der Bestimmung um tatsächlich aufgenommenes oder unspezifisch angelagertes Calcium handelt. Lanthan^{3+} ist aufgrund seines Ioneneradius, der dem des Calcium^{2+} ähnlich ist, in der Lage, Calciumkanäle in der Membran zu blockieren, und es verdrängt extrazellulär vorhandenes Calcium. Durch Zugabe von Lanthan^{3+} ins Waschmedium kann also der unerwünschte Efflux verhindert werden und man erspart weitere Methoden zur Bestimmung des Extrazellulärraumes, z.B. durch

^{3}H-Mannitol als "extracellular space marker" (Hellman et al., 1971). Hellman modifizierte diese Lanthanwaschmethode dergestalt, daß er die Waschvorgänge bei 1°C durchführte. Er wies nach, daß die Senkung der Temperatur von 20° auf 1° ebenfalls zu einer deutlichen Senkung des Calcium-Effluxes führte (1978).

3.1.1 Reaktions- und Inkubationsgefäße

Um nun diesen Lanthanwaschvorgang so rasch wie möglich und ohne Verlust an Inselmaterial durchführen zu können, wurden folgende Reaktionsgefäße verwendet:

1. Ausführung, verwendet bei den Versuchen 4.1 bis 4.3

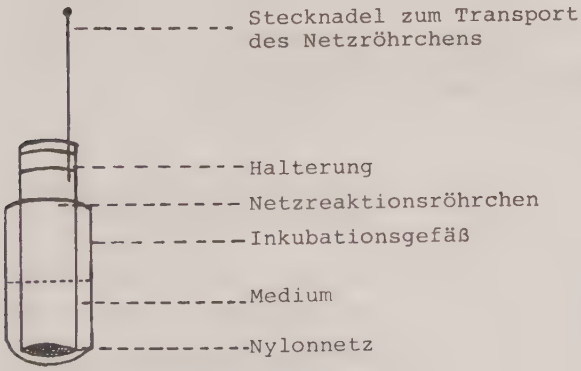


Abb. 12

Einem Polystyrolröhrchen von 10 mm Durchmesser und 40 mm Höhe wurde der Rundboden abgesägt und es wurde durch ein Nylonnetzblättchen von 10 mm Durchmesser,

Maschenweite 54 µm, verschlossen. Auf dieses Nylonnetz wurden die Inseln gebracht und das Reaktionsröhrchen in 1 ml des entsprechenden Mediums eingebracht, das in Polystyrolröhrchen von 15 mm Durchmesser und 30 mm Höhe einpipettiert worden war.

Beim Wechsel von einem in das andere Medium wurde das Reaktionsröhrchen zur Entfernung von Mediumsresten kurz auf eine saugfähige Zellstoffunterlage gestellt.

Nach der Lanthanwaschung wurde das Nylonnetz von dem Röhrchen abgezogen und zusammen mit den Inseln zur Zählung in ein Szintillatorgläschen übergeführt.

Wie die unter 3.1.3 beschriebenen Ergebnisse zeigten, mußten ab Versuch 4.4 die Netzreaktionsröhrchen verkleinert werden. Es wurden in dieser 2. Ausführung Polystyrolröhrchen mit einem Durchmesser von 6,5 mm und 40 mm Höhe genauso behandelt wie bei der 1. Ausführung.

2. Ausführung, verwendet ab Versuch 4.4

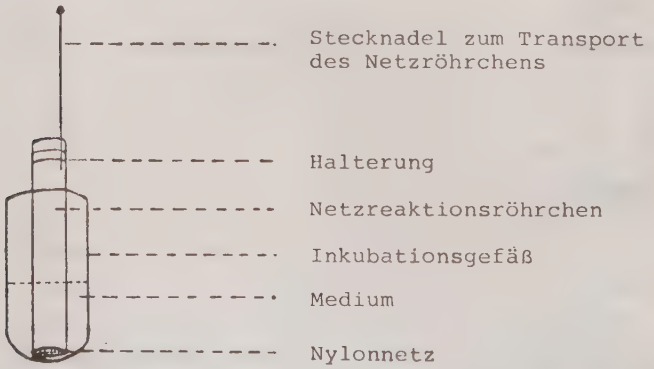


Abb. 13

Solche mit Netz verschlossenen Reaktionsröhrchen gewährleisten:

1. Eine schonende Behandlung der isolierten Inseln, da diese nur einmal auf das Netz pipettiert werden und zum Wechseln von Medium zu Medium mechanisch unbeansprucht und auf diesem liegend übergeführt werden.
2. Keinen Verlust an Inselmaterial während des Transports von Medium zu Medium.
3. Die radioaktiven Inseln müssen nicht mehr einzeln transportiert werden, damit sind Kontaminationsgefahren vermindert.
4. Das Wechseln des gesamten Röhrchens geht schnell und sicher ohne Zeitverlust.

3.1.2 ^{45}Calcium und seine Bestimmung im β-Counter

^{45}Calcium ist ein Radionuklid mit überwigender β-Strahlung und verschwindend geringem γ-Strahlenanteil:

^{45}Ca

β^- : .25, ... Mev

γ : .o125,

Seine Halbwertszeit beträgt 164 Tage (Fa. Amersham Buchler, Braunschweig).

Als Meßgerät stand ein PACKARD TRI CARB Mod. 3385, Liquid Scintillation Spectrometer zur Verfügung.

Bestimmung des Energiebereichs, in dem ^{45}Calcium zu messen war:

Dazu wurden 5 Proben mit einem Standard ^{45}Calcium (als $CaCl_2$ in Wasser) hergestellt und in allen drei Kanälen des Gerätes gemessen: H 3, C 14, P 32.

Beim Vergleich der jeweils gemessenen cpm und der nach dem Kalibrierungsdatum berechneten dpm für die entsprechende Probe ergab sich im C 14-Kanal eine efficiency von 90 %. Im P 32-Kanal erschienen keine counts, im H 3-Kanal nach Abklingen von Lichteffekten während einer zweistündigen Ruhezeit unter Lichtabschluß ca. 1/10 der C 14-cpm. Als Meßzeit wurde eine Minute gewählt, weil in dieser Zeit die Anzahl der gemessenen counts in einem Bereich lagen, in dem Zählerungenauigkeiten des Gerätes durch die Totzeit statistisch nicht mehr ins Gewicht fielen. Eine Erhöhung der Zählzeit brachte keine Verbesserung der Zählergenauigkeit der Standardproben.

Es wurden deshalb sämtliche Proben im C 14-Kanal und im H 3-Kanal eine Minute gemessen. Ein externer Standard wurde mitgemessen und die ESR (extern standard ratio) ausgedruckt.

Einfluß von Störfaktoren, die im Szintillatorgläschen vorhanden waren:

Die zu messenden Proben enthielten neben dem Inselgewebe folgende Stoffe: Hyamin zur Auflösung der Inseln, das Nylonnetz und die Szintillatorlösung Unisolve I.

Zunächst wurde das Verhalten des Nylongewebes gegenüber Hyamin und Unisolve I, sowie sein Einfluß auf die Messung der Radioaktivität überprüft.

1. In 6 Gläschen mit steigender Hyaminkonzentration (0, 10, 20, 50, 100 und 500 µl) und jeweils 10 ml Unisolve I wurden Netzstückchen gegeben und der

Ansatz 30 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach jeweils 2 Tagen wurden die Netze mikroskopisch auf Veränderungen geprüft.

2. Dieselbe Versuchsreihe wurde 2 Tage bei 37°C (Inkubationstemperatur) und regelmäßigem Schütteln, 10 mal pro Tag, weiterbehandelt.

   Ergebnis:
   Weder bei der Kontrolle während 1., noch nach 2. konnten mikroskopische Veränderungen oder Auflösungserscheinungen am Netz beobachtet werden.

3. Der Einfluß der Netze auf die Messung im ß-Counter wurde dadurch überprüft, daß 5 Proben mit einem Standard ^{45}Calcium 43 000 dpm und 15 ml Unisolve I hergestellt wurden. Die Messung erfolgte sofort und nach 24 Stunden. Danach wurde den Proben 1 und 2 jeweils 1 Netz, den Proben 3 bis 5 jeweils 3 Netze zugegeben, umgeschüttelt und sofort wieder und nach 24 Stunden gemessen.

   Ergebnis:
   Die gemessenen cpm im C 14-Kanal schwankten beim Vergleich aller Messungen:

Probe 1:	max. 40 907	min. 40 124
Probe 2:	max. 40 396	min. 39 191
Probe 3:	max. 42 661	min. 41 330
Probe 4:	max. 42 087	min. 40 384
Probe 5:	max. 41 927	min. 41 398

   Das spezifische Gewicht der Nylonnetze ist wesentlich höher als das des Cocktails, so daß das Netzmaterial während der Messung immer am Gefäßboden liegt. Dadurch hat es nach obigen Ergebnissen keinen Einfluß auf die Messung der Proben.

Nach Absicherung der Störfreiheit des Nylonnetzes wurde der Einfluß der Probenbestandteile Pankreasgewebe, Hyamin und verwendete Hemmstoffe (t-BHP, Diamid) auf die Zählung anhand einer Quenchreihe untersucht. Dazu wurden 17 Proben mit einem Standard ^{45}Calcium 42 600 dpm und 15 ml Unisolve I mit steigender Konzentration der einzelnen Quenchfaktoren hergestellt.

Inseln, zwischen 0 und 50 Stück;
darüberhinaus zusätzlich exokrines Pankreasgewebe bis 50 mg
(spätere Probenmenge 20 Inseln)

Hyamin von 0 bis 500 µl)
(spätere Probenmenge 20 µl)

t-BHP 2 mM-Lösung von 0 bis 10 µl
(spätere Probenmenge 0 bis 10 µl)

Diamid 0,1 mM-Lösung von 0 bis 10 µl
(spätere Probenmenge 0 bis 1 µl)

Die Messungen erfolgten a) sofort
b) nach 24 Stunden
c) nach 72 Stunden

Die Meßzeit betrug 1 Minute.

Ergebnisse:

Die ESR-Werte sanken von Probe 1 bis Probe 17:

a) von .7634 auf .6629 Diff. .1005
b) von .7563 auf .6552 Diff. .1011
c) von .7224 auf .6237 Diff. .0987

Die cpm-Werte im C 14-Kanal schwankten, nicht linear:

a) von max. 40 209 auf min. 34 456 Diff. 5753
b) von max. 40 482 auf min. 37 129 Diff. 3353
c) von max. 40 189 auf min. 37 973 Diff. 2216

Schlußfolgerung:

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen, mit den genannten Konzentrationen an Quenchfaktoren, ist ^{45}Calcium im verwendeten β-Counter im C 14-Kanal ohne statistisch auswertbaren Quencheffekt meßbar.

Jede Probenserie wurde deshalb im C 14- und H 3-Kanal gemessen. Um die jeweilige efficiency exakt zu bestimmen, wurden bei jeder Probenserie je Hauptinkubationsmedium 10 µl in einem zusätzlichen Szintillatorgläschen als "interner Standard" mitgemessen.

Absicherung der Störfreiheit von DIP und DIP-Salz

Um die ab Versuch 4.6 verwendeten pharmakologischen Hilfsstoffe DIP und DIP-Salz auf ihren Einfluß auf die Bestimmung von ^{45}Calcium im β-Counter zu untersuchen, wurde für jeden Stoff eine eigene Quenchreihe aufgestellt.

DIP:

Dazu wurden 11 Proben mit einem Standard ^{45}Calcium 37 338 dpm und 15 ml Unisolve I mit steigenden Konzentrationen DIP versetzt:

Probe	1	2	3	4	5
DIP (µg)	2,83	5,65	11,3	22,6	56,5

Probe	6	7	8	9	10
DIP (µg)	113	226	339	565	1130

Probe	11	
DIP (µg)	2825	

(spätere Probenmenge zwischen 7 und 28 µg/ml Hauptinkubationsmedium)
Die Messung erfolgte nach 24 Stunden. Die Meßzeit betrug 1 Minute.

Ergebnisse:

Die ESR-Werte schwankten zwischen
.6031 und .8276 Differenz .2262
Die cpm-Werte im C 14-Kanal schwankten, nicht linear:
von max. 35 755 bis min. 33 157 Differenz 2 598

Schlußfolgerung:

Die verwendeten Konzentrationen an DIP haben auf die Bestimmung von ^{45}Calcium keinen statistisch auswertbaren Einfluß.

DIP-Salz:

Dazu wurden 7 Proben mit einem Standard ^{45}Calcium von 29 972 dpm in 15 ml Unisolve I mit steigenden Konzentrationen an DIP-Salz versetzt.

Probe	1	2	3	4	5
DIP-Salz (µg)	0	11,3	28,2	56,5	282

Probe	6	7	
DIP-Salz (µg)	564	2821	

(spätere Probenmenge zwischen 14 und 56 µg/ml Hauptinkubationsmedium)
Die Messung erfolgte nach 24 Stunden. Die Meßzeit betrug 1 Minute.

Ergebnisse:

Die ESR-Werte schwankten zwischen
.7055 und .8689 Differenz .1634
Die cpm-Werte im C 14-Kanal schwankten, nicht linear:
von max. 27 171 bis min. 24 404 Differenz 2 767

Schlußfolgerung:

Die verwendeten Konzentrationen an DIP-Salz haben auf die Bestimmung von ^{45}Calcium im β-Counter keinen statistisch auswertbaren Einfluß.

3.1.3 Leerwertversuche zur Standardisierung des Backgrounds

Nach der ausgearbeiteten Versuchsanordnung wurde das radioaktive Inselmaterial zusammen mit dem Nylonnetz im β-Counter gezählt. Deshalb mußte zunächst geklärt werden, ob die an den Nylonnetzen adsorbierte Radioaktivität einen konstanten Wert hat oder ob diese Hintergrundswerte stark schwanken.

Dazu wurden 10 Netzröhrchen mit Hauptinkubationsmedium II 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Calciumkonzentration 0,04 mM, spez. Aktivität 440 Ci/mol.). Der Hauptinkubation und einer zweiminütigen Kurzspülinkubation in Medium I bei 1°C schloß sich die einstündige Lanthanwaschung in Medium III bei gleicher Temperatur an.

Die anschließende Radioaktivitätsmessung der Netze ergab im C 14-Kanal bei einer Aktivität des Standards von 25 000 cpm (10 µl Hauptinkubationsmedium):

Netz	1	2	3	4	5
cpm	1031	498	443	1064	972

Netz	6	7	8	9	10
cpm	692	729	278	181	148

Die von den Netzen aufgenommene Radioaktivität schwankte also zwischen 148 und 1064, d.h. um den Faktor 7.

Um den Grund für diese starken Schwankungen zu finden und um sie in einem möglichst niedrigen Bereich zu halten, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Radioaktivitätsmessungen der einzelnen Spülmedien (jeweils 10 µl)
2. Spülen der Netze unter fließendem Medium (auf Vakuumflasche aufgesetzt)
3. Mehrmaliges Umschütteln während der Lanthanfixierinkubation
4. Konstanthalten anderer Parameter, z.B. sauberes Absaugen von Mediumsresten auf Zellstoffunterlage zwischen den einzelnen Inkubationsschritten, pH-Stabilität der Medien.
5. Verkleinerung der Netzfläche durch Halbierung des Radius des Reaktionsröhrchens
6. Versuche zur Messung des radioaktiven Inselmaterials ohne Netze

ad 1.: Radioaktivitätsmessungen der einzelnen Spülmedien

Um die Möglichkeit der Kontamination der Netze durch eventuell anhaftende radioaktive Mediumsreste zu untersuchen, wurden 10 Netzröhrchen wie oben angegeben inkubiert. Allerdings wurde die Lanthanwaschung bei 4 von ihnen auf drei mal 20 Minuten in jeweils frischem Medium statt einmal 60 Minuten im gleichen Medium ge-

ändert. Ein Netz wurde nach der Hauptinkubation und dem Absaugen auf Zellstoff direkt ohne jegliche Spülinkubation der Messung zugeführt. Neben der Messung der Netze wurden von jedem Spülmedium 10 µl als Maß für seine Radioaktivität mitgemessen (Aktivität des Standards 10 µl HI-Medium 35 000 cpm):

Lanthanwaschung: 1 x 60 Minuten

Netz	1	2	3	4	5
cpm	915	3071	1947	2606	4478

Lanthanwaschung: 3 x 20 Minuten

Netz	6	7	8	9	
cpm	2084	2641	3170	988	

Direkte Messung ohne Lanthanwaschung

Netz	10	
cpm	8203	

Untersuchtes Medium	cpm
Kurzspülmedium	156
Lanthanmedium/60 min	29
Lanthanmedium/20 min I	23
Lanthanmedium/20 min II	27
Lanthanmedium/20 min III	17

Ergebnis:

Eine Aufteilung der einstündigen Lanthanwaschung bringt keine Verbesserung der Streuung. Die Aktivität der Messung stammt nicht von Mediumsresten, da die gesamte abspülbare Aktivitätsmenge in 1., dem Kurzspülmedium auftaucht. Es muß sich also um unspezifisch adsorbiertes ^{45}Calcium an den Netzen handeln.

ad 2.: Spülen der Netze unter fließendem Medium

Das Spülen der Netze vor der eigentlichen Spülinkubation fließend mit dem jeweiligen Medium wurde folgendermaßen durchgeführt:

Nach der Hauptinkubation und dem Trockensaugen auf Zellstoff wurden die Netzröhrchen auf eine Glasfritte aufgesetzt, die über eine Waschflasche mit der Wasserstrahlpumpe verbunden war. Unter Vakuum wurden ca. 10 ml des Kurzspülmediums durch das Röhrchen gezogen. Nach dem Trockensaugen folgte die Kurzspülinkubation. Derselbe Vorgang wurde vor der Lanthanwaschung entsprechend wiederholt.

Die Meßergebnisse ergaben keinerlei Verbesserung des Backgrounds (Aktivität des Standards 10 µl HI-Medium 35 000):

Netz	1	2	3	4	5
cpm	915	3164	1958	2614	4510

Netz	6	7	8	9	10
cpm	2008	2775	3242	919	2641

ad 3. und 4.: Mehrmaliges Umschütteln und Konstanthalten anderer Parameter

Während der einstündigen Lanthaninkubation wurden die Proben wiederholt umgeschüttelt, und zwar durch senkrechtes Auf- und Abbewegen des Netzröhrchens im eisgekühlten Lanthanmedium.

Darüberhinaus wurde auf ein exaktes Beibehalten des vorgeschriebenen pH-Wertes der Spülmedien geachtet, weil sich durch Nachmessung gezeigt hatte, daß sich die Tris-gepufferten Medien ins Alkalische (bis pH 9 bis 10) verschoben hatten. Diese alkalischen Medien führten zu besonders hohen Netzaktivitäten (Aktivität des Standards 10 µl HI-Medium: 35 000):

Netz 1 bis 8 : normaler Arbeitsgang
Netz 9 und 10: Netze ohne Waschung gemessen

Netz	1	2	3	4	5
cpm	190	185	271	248	230

Netz	6	7	8	9	10
cpm	304	174	188	2187	2571

Nach diesen Erkenntnissen wurden die Versuche 4.1 bis 4.3 ausgeführt und die beschriebenen Ergebnisse gefunden. Acht Netzröhrchen wurden jeweils mit den Inseln im entsprechenden Inkubationsmedium inkubiert, während je 2 Netzröhrchen als Leernetze zur Backgroundbestimmung mitinkubiert wurden. Ihr Mittelwert wurde als Netzbackground von den jeweiligen Gesamt-cpm abgezogen und die Rest-cpm als Inselgehalt angenommen.

Aus folgenden Gründen mußte das Problem des Backgrounds noch einmal angegangen werden:

a) Einzelne Netzmessungen während der Bestimmungsserie zeigten wieder geringe Schwankungen und der cpm-Gehalt der Netze schwankte von Meßserie zu Meßserie stark.

b) Die Versuche 4.1. bis 4.3 wurden bei einer Calciumkonzentration im Medium von 0,04 mM und einer spez. Aktivität von 440 Ci/mol durchgeführt. Ab Versuch 4.4 wurde die Calciumkonzentration auf 2,6 mM erhöht, was bei einer absolut gleichbleibenden Menge markiertem Calcium zur Senkung der spezifischen Aktivität auf 7,8 Ci/mol führte. Dadurch wurden die cpm-Werte der Inseln geringer. Bei gleich hohen Netzaktivitäten würde dies zu einer Steigerung der Meßfehler führen.

c) Die Streuungen der Meßergebnisse mußten verringert werden, da Dosis-Wirkungs-Beziehungen für DIP und DIP-Salz zu erstellen waren.

ad 5.: Verkleinerung der Netzfläche

Es wurden nun die Reaktionsröhrchen in der Ausführung 2 verwendet, was zu einer Flächenverringerung der Netze führte. Die Handhabung der kleineren Röhrchen blieb die gleiche, der Versuchsablauf mußte nicht geändert werden. Bei der Messung der kleineren Leernetze im Vergleich zu den großen ergaben sich folgende Werte: (Aktivität des Standards 10 µl HI-Medium: 230 000 cpm)

Netz ø 10 mm	1	2	3	4	5
cpm	1035	479	433	394	821

Netz ø 6,5 mm	6	7	8	9	10
cpm	591	1079	1117	1569	771

Netz ø 6,5 mm	11	12	13	
cpm	668	561	709	

Leider ergab sich aus der Flächenverringerung der Netze keine Verbesserung der Backgroundwerte und ihrer Schwankungen.

Es muß wohl angenommen werden, daß ein bestimmter Prozentsatz der Gesamtradioaktivität unauswaschbar an das Nylonnetz bindet. Betrachtet man das Verhältnis zwischen Gesamtradioaktivität im Medium und nicht auswaschbarer Netzaktivität, so liegt dieser Netzanteil im Bereich unter 0,1 %! Dies wäre für die Bestimmung durchaus tolerierbar, lägen nicht die durch das Inselmaterial aufgenommenen Mengen ^{45}Calcium im selben Bereich.

Es mußte also ein Weg gesucht werden, das radioaktive Inselmaterial nach Auflösung durch Hyamin von den Netzen abzuspülen, so daß diese nicht mehr im β-Counter mitgemessen werden müssen.

ad 6.: Versuche zur Messung des radioaktiven Inselmaterials ohne Netze

Dazu wurde zunächst folgendes versucht:

Sechs Röhrchen der Ausführung 2 wurden dem üblichen Inkubationsschema unterzogen. Nach der Lanthanfixierinkubation und dem Entfernen von Mediumsresten wurden die Netze nicht abgezogen, sondern die 20 µl Hyamin auf das noch am Röhrchen klebende Netz aufgetropft. Danach wurden die 14 ml Unisolve I durch Röhrchen und

Netz durchgespült, in das Szintillationsgefäß.

Die Messungen ergaben im einzelnen folgende Werte:
(Aktivität des Standards 10 µl HI-Medium: 238 000)

Durchspülte Lösung von Netz	1	2	3	4
cpm	503	493	225	551

Durchspülte Lösung von Netz	5	6	
cpm	281	390	

Dieses Ergebnis zeigte zwar eine deutliche Verringerung der cpm-Werte des Backgrounds, allerdings erfüllten die starken Schwankungen noch nicht die gestellten Anforderungen.

Der Grund für die nach wie vor hohen Unterschiede von Netz zu Netz liegt wahrscheinlich darin, daß durch diese Durchspülmethode an der Röhrcheninnenseite anhaftende Radioaktivitätsmengen unterschiedlich stark abgelöst werden und somit die Messung unterschiedlich stark beeinflussen.

Es wurde aufgrund dieser Erkenntnisse ein vollkommen anderer Weg gewählt:

Neun Röhrchen der Ausführung 2 wurden dem üblichen Inkubationsschema unterzogen, die Netze zum Schluß von den Röhrchen abgezogen und ins Szintillationsgläschen übergeführt. Nach dem Auftropfen der 20 µl Hyamin und Auffüllen mit 14 ml Unisolve I wurde das Gläschen zugeschraubt und 4 mal 15 Sekunden auf dem Whirlmix bei maximaler Umdrehung geschüttelt. Nach Absetzen des Netzblättchens wurde die Lösung vorsichtig in ein zweites

Szintillatorgefäß dekantiert. Die Radioaktivität dieser Lösung wurde bestimmt:
(Aktivität des Standards 10 µl HI-Medium: 455 000 cpm)

Dekantierte Lösung von Netz	1	2	3	4	5
cpm	98	143	207	105	319

Dekantierte Lösung von Netz	6	7	8	9	
cpm	361	281	325	140	

Wiederum zeigten die Ergebnisse eine geringe Verbesserung gegenüber den letzten, allerdings traten immer noch zu starke Schwankungen auf. Diese konnten allerdings dadurch beseitigt werden, daß Röhrchen und Netze vor dem Verkleben in Äthanol 90 % im Ultraschall 15 Minuten gereinigt wurden. Danach wurde beim Verkleben und bis zur Verwendung peinlich darauf geachtet, daß eine Wiederverschmutzung, speziell der Röhrcheninnenseite und der Netze, durch Staub oder Polystyrolreste vom Absägen des Bodens ausgeschlossen wurde.

Die Inkubation von neun so behandelten Röhrchen nach oben beschriebenem Versuchsablauf ergab folgende Ergebnisse: (Aktivität des Standards 10 µl HI-Medium 455 000 cpm)

Dekantierte Lösung von Netz	1	2	3	4	5
cpm	88	102	96	63	115

Dekantierte Lösung von Netz	6	7	8	9	
cpm	117	113	87	101	

Bei jeder Versuchsserie ab 4.4 wurden 2 bis 3 Leernetze mitinkubiert und gemessen. Die Kontinuität der Backgroundwerte und ihre geringe Schwankung von Versuch zu Versuch sprach für eine Beibehaltung der erarbeiteten Methode.

3.2 Isolierung Langerhansscher Inseln nach Lacy und Kostianovsky (1967)

Die Ratte wurde mit Äther narkotisiert, das Abdomen durch einen Schnitt bis zum Brustbein und durch Querschnitte an den beiden Rippenbögen geöffnet. Unter den Leberlappen wurde das Duodenum mit einer Pinzette hervorgezogen, um den Ductus pancreaticus sichtbar zu machen und ihn zur Leber hin abzubinden. Nach Abklemmen des Duodenums zum Magen hin wurde durch den Ductus pancreaticus 10 ml eisgekühlte Hanks'Lösung injiziert. Dadurch wurde das Pankreas gut sichtbar aufgebläht und es konnte mit einer Schere von Magen, Leber, Milz und Darm ab- und herausgetrennt werden und sofort in eine Petrischale mit eiskalter Hanks'Lösung gelegt werden. Dort wurden sämtliche noch vorhandenen Fettpartikel entfernt. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung des Pankreas mit einer Schere in möglichst gleichmäßige kleine Teilchen, die sich durch den Konus einer 5 ml-Rekordspritze aufsaugen ließen. Mit Hanks' Lösung wurde das Volumen in der Spritze auf 5 ml ergänzt, anschließend gab man den gesamten Inhalt zu 30 mg Collagenase, die sich in einem 20 ml-Schnappdeckelglas befand. Bei 37^{o}C ließ man die Collagenase in einem Schüttelwasserbad unter kräftigem Schütteln so lange auf die Pankreasteilchen einwirken, bis eine homogene, hellbraune, schleimige Flüssigkeit entstanden war. Dies dauerte je nach Aktivität der Collagenase und Größe der Pankreaspartikel 7 bis 14 Minuten.

Die Flüssigkeit wurde in einem Becherglas 3 mal durch den Konus einer 5 ml-Rekordspritze zur weiteren Zerkleinerung größerer Partikel gezogen und dann durch ein Plastikteesieb in einen mit etwa 15 ml eiskalter Hanks'Lösung gefüllten 25 ml-Meßzylinder gegeben. Auf diese Weise wurde die Collagenase-Reaktion abgestoppt. Die Suspension schüttelte man kräftig durch und ließ sie dann zum Absetzen der Teilchen stehen. Exokrine Partikel haben ein kleineres spezifisches Gewicht als Langerhanssche Inseln und damit auch unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit. Durch Absaugen des Überstandes und erneutes Aufschwemmen war es möglich, exokrine Partikel und Langerhanssche Inseln zu trennen. Dieser Vorgang wurde etwa 8 mal wiederholt, die Inseln wurden unter einem Stereomikroskop mit Hilfe einer Mikropipette aussortiert. Alle Arbeitsgänge wurden im Eisbad durchgeführt.

3.3 Vorinkubation

Zur Equilibrierung des Stoffwechsels nach der Isolierung wurden die Inseln einer Vorinkubation unterzogen. Dazu wurden alle Inseln in ein 5 ml-Gläschen einsortiert und die Mediumsreste abgesogen. Nach Zugabe von 2 ml KRB-Lösung, in der 2 % Rinderserumalbumin und 3 mM Glucose gelöst worden waren, mit einem pH 7,35, wurde mit Carbogen begast und bei 37°C im Schüttelwasserbad langsam geschüttelt. Diese Vorinkubation dauerte 30 Minuten. Anschließend wurde der Mediumsüberstand abgesaugt und die Inseln mehrere Male in eiskalter Hanks'Lösung gewaschen.

3.4 Hauptinkubation

Zur Hauptinkubation wurden aus dem eiskalten Hanks' Bad jeweils 20 Inseln in ein Netzröhrchen einsortiert und diese in die zugehörigen Reaktionsröhrchen eingetaucht, in die je 1 ml des Hauptinkubationsmediums einpipettiert worden war. Alle Reaktionsröhrchen wurden in einem festen Reagenzglasständer fixiert und im Schüttelwasserbad bei 37°C und ca. 40 Bewegungen pro Minute inkubiert. Um auch während der Hauptinkubation eine Begasung mit Carbogen zu sichern, wurde über den gesamten Reagenzglasständer eine Plexiglashaube gestülpt, unter der, gespeist durch 2 Glasröhrchen, dauernd frische Carbogenatmosphäre herrschte.

Das Hauptinkubationsmedium war bei Versuch 4.1 bis 4.3 Tris-Puffer mit verminderter Calciumkonzentration von 0,04 mM und einer spezifischen Aktivität von 440 Ci/mol mit den entsprechenden Hemmstoffen in genannter Konzentration. Ab Versuch 4.4 wurde die Calciumkonzentration im Medium auf 2,6 mM angehoben, was dem physiologischen KRB-Puffer entspricht. Dadurch veränderte sich die spezifische Aktivität auf 7,8 Ci pro mol. Die Hauptinkubation dauerte 30 Minuten.

3.5 Kurzspülinkubation

Der Hauptinkubation schloß sich sofort eine zweiminütige Spülinkubation bei 1°C an. Dies diente zur Entfernung von eventuell vorhandenen Resten Hauptinkubationsmedium, die sonst ins anschließende Lanthanwaschmedium mitgeschleift würden. Bis Versuch 4.3 wurde dazu reiner Tris-Puffer verwendet. Hellman hatte dies in der Originalarbeit (1978) so beschrieben, um später zwischen Lanthan-displaceable Calcium und Lanthan-non-

displaceable Calcium unterscheiden zu können. Da der sog. "Lanthan-displaceable Calcium-Pool" für die gegebene Aufgabenstellung nicht von Interesse war, wurde ab Versuch 4.4 dem Kurzspülinkubationsmedium 2 mM Lanthanchlorid zugesetzt, was einen möglichen Efflux von intrazellulärem Calcium während dieser Zeit verhindert. Auch die Senkung der Temperatur auf 1°C hemmt den Efflux von Calcium (Hellman, 1978).

3.6 Lanthanfixierinkubation

Es schloß sich die 60 minütige Fixierinkubation in jeweils 1 ml Tris-Puffer, dem 2 mM Lanthanchlorid zugefügt worden waren, im Eisbad an. Während dieser Zeit wurden die Röhrchen 3 mal umgeschüttelt.

Die von Mediumsresten befreiten Netze wurden schließlich von den Röhrchen mit einer Pinzette abgezogen und, wie unter 3.1.3 beschrieben, weiterbehandelt.

3.7 Umrechnung der Meßergebnisse (cpm) in ^{45}Calciumaufnahme (mol/10 Inseln)

Um die Meßergebnisse exakt vergleichen und statistisch auswerten zu können, müssen die Meßwerte auf einen Bezugstag umgerechnet werden. ^{45}Calcium zerfällt mit einer Halbwertszeit von 164 Tagen, so daß im Laufe der Zeit bei gleichen Pipettiermengen immer weniger Counts gemessen werden.

Als Bezugstag wird das Kalibrierungsdatum der Lösung genommen. An diesem Datum gelten die von Amersham angegebenen Werte:

1.) Aktivität in mCi
2.) Calciumgehalt in mg ^{45}Ca
3.) Volumen in ml

Umrechnungsfaktoren:

$$1\ Ci \triangleq 3{,}7 \cdot 10^{10}\ Bq \left[\frac{\text{Zerfälle}}{s}\right]$$

$$1\ pCi \triangleq 0{,}037\ Bq = 2{,}22\ dpm \left[\frac{\text{Zerfälle}}{min}\right]$$

$$0{,}\overline{450}\ pCi \triangleq 1\ dpm$$

Berechnung des aufgenommenen Calciums aus der Radioaktivitätsmessung:

a_o = dpm ^{45}Calcium aus 10 µl Hauptinkubationsmedium am Kalibrierungstag, berechnet aus Firmenangabe und Pipettiermengen an ^{45}Calcium für 1 ml Hauptinkubationsmedium

a = dpm ^{45}Calcium aus 10 µl Hauptinkubationsmedium am Meßtag, berechnet nach Zerfallsgesetz

b = cpm ^{45}Calcium aus 10 µl Hauptinkubationsmedium am Meßtag (sog. "interner Standard")

c = cpm ^{45}Calcium aus der Probe am Meßtag

d = dpm ^{45}Calcium der Probe, berechnet aus Proben-cpm am Meßtag (c)

e = efficiency-Faktor, berechnet aus a und b

$$d = e \cdot c$$

$$= \frac{a}{b} \cdot c$$

$$a : a_o = d : x$$

$$\frac{a}{a_o} = \frac{a \cdot c}{b \cdot x}$$

$$x = \frac{a \cdot c \cdot a_o}{b \cdot a}$$

$$= \frac{a_o}{b} \cdot c$$

x = aufgenommenes ^{45}Calcium der Inseln in dpm bezogen auf das Kalibrierungsdatum als Bezugstag

$$x = \frac{a_o \ \text{dpm}}{\text{int. Standard} \ \text{cpm}} \cdot \text{Probe} \ \text{cpm}$$

Berechnung der a_o-Werte der verwendeten Lösungen:

Lösung I (16.04.79):
20,8333 µCi pro 1 µg ^{45}Calcium, a_o = 389 474

Lösung II (21.01.80):
30,0500 µCi pro 1 µg ^{45}Calcium, a_o = 433 566

Lösung III (09.06.80):
14,4440 µCi pro 1 µg ^{45}Calcium, a_o = 450 216

Lösung IV (04.08.80):
23,7500 µCi pro 1 µg ^{45}Calcium, a_o = 440 000

Lösung V (24.11.80):
21,5100 µCi pro 1 µg ^{45}Calcium, a_o = 450 216

Diese a_o-Werte ergaben sich bei folgenden µl Stammlösung pipettiert zu 1 ml Hauptinkubationsmedium:

Lösung I : 10,00

Lösung II : 10,00

Lösung III : 13,00

Lösung IV : 10,00

Lösung V : 10,14

Umrechnung von x dpm ^{45}Calcium in molare Calciummengen pro 10 Inseln

45 g Calcium ≙ 1 mol

1 fg Calcium ≙ 0,022 fmol

Da die Meßwerte aus 20 Inseln stammen, das Endergebnis aber auf 10 Inseln bezogen wird, müssen die berechneten Mengen in fg Calcium mit dem Faktor 0,011 multipliziert werden, um fmol/10 Inseln zu erhalten.

x dpm = 450,4504 · x fCi

Lösung I : 20,8333 fCi ≙ 1 fg ^{45}Ca
450,4504 · x fCi ≙ 21,621653 · x fg ^{45}Ca

Lösung II : 30,0500 fCi ≙ 1 fg ^{45}Ca
450,4504 · x fCi ≙ 14,990029 · x fg ^{45}Ca

Lösung III: 14,4440 fCi ≙ 1 fg ^{45}Ca
450,4504 · x fCi ≙ 31,185987 · x fg ^{45}Ca

Lösung IV : 23,7500 fCi ≙ 1 fg ^{45}Ca
450,4504 · x fCi ≙ 18,966332 · x fg ^{45}Ca

Lösung V : 21,5100 fCi ≙ 1 fg ^{45}Ca
450,4504 · x fCi ≙ 20,941441 · x fg ^{45}Ca

Ergebnisse in fmol ^{45}Calcium pro 10 Inseln:

Lösung I : 0,2402403 · x fmol

Lösung II : 0,1665557 · x fmol

Lösung III: 0,3465106 · x fmol

Lösung IV : 0,2107368 · x fmol

Lösung V : 0,2326824 · x fmol

3.8 Insulinbestimmung

Die Insulinkonzentration im Medium wurde in Doppelbestimmungen durch Radioimmunassay (Doppelantikörpermethode nach Soeldner und Slone) mit dem INSIK^{R}-Kit gemessen. Die Eichkurve wurde mit Ratteninsulin erstellt.

a) Durchführung der Bestimmung

Die aufgetauten Proben und die Standardlösungen für die Eichkurve wurden mit 0,9 ml des folgenden Puffers verdünnt:

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$		550 mg
Rinderserumalbumin		100 mg
Aqua bidest.	ad	100 ml

Von den auf diese Weise erhaltenen Proben (Volumen 1 ml) wurden wiederum 0,1 ml für die Bestimmung in zuvor durchnummerierte Polystyrol-Teströhrchen einpipettiert. Mit der Verdünnungsreihe für die Eichkurve (Bereich 0 bis 15 µE Insulin/0,1 ml) verfuhr man ebenso. Als Leerwert legte man 0,1 ml des obigen Puffers vor (Nullpunkt der Eichkurve).

Der lyophilisierte Antikörper wurde laut Vorschrift gelöst, jeweils 100 µl davon wurden zu den Proben gegeben, die sorgfältig durchmischt und danach 6 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt wurden. Nach Zugabe des gelösten ^{125}J-markierten Insulins (100 µl) inkubierte man die Proben 18 Stunden im Kühlschrank.

Anschließend pipettierte man zu allen Proben 1 ml kalten Puffer (Zusammensetzung siehe oben) und zentrifugierte 20 Minuten lang mit 3500 U/min bei 4^{o}C, so daß der Überstand vom Doppelantikörperkomplex dekantiert werden konnte. Eventuell am Gläschen haftende Tröpfchen wurden mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Die Proben wurden in einem automatischen Gamma-Zähler gemessen. Die Zähldauer wurde so eingestellt, daß die Proben für den Nullpunkt der Eichkurve (sie enthielten ausschließlich markiertes Insulin) mehr als ca. 6000 Counts aufwiesen. Mit dieser Zeit, meistens 60 Sekunden, wurden dann alle Proben des Bestimmungsansatzes gemessen.

b) Berechnung der Insulinwerte

Aus den Doppelbestimmungen ließ sich der Mittelwert der Zählrate bestimmen. Man bildete den Quotienten aus der jeweiligen Zählrate der Proben und der Zählrate des Leerwerts und konnte dann, anhand der ebenfalls auf diese Weise erstellten Eichkurve, die Insulinwerte der Proben in einem Computerprogramm errechnen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Einfluß von verschiedenen Glucosekonzentrationen auf die Aufnahme von ^{45}Calcium in Langerhanssche Inseln der Ratte, bei einer Calciumkonzentration von 0,04 mM im Inkubationsmedium.

Von Hellman und Mitarbeitern (1971) und von Malaisse-Lagae und Malaisse (1971) konnte gezeigt werden, daß die Aufnahme von ^{45}Calcium in die Langerhanssche Insel von der jeweiligen Glucosekonzentration im Inkubationsmedium abhängig ist. Um zu prüfen, ob das Meßsystem intakt ist, wurde zunächst ebenfalls der Einfluß einer sekretionsstimulierenden Glucosemenge auf die Calciumaufnahme untersucht.

In der Abbildung 14 und Tabelle 1 ist der Einfluß von 3 mM und 20 mM Glucose auf die Aufnahme von Lanthannon-displaceable Calcium isolierter Rattenpankreasinseln dargestellt. Die Calciumkonzentration im Medium betrug 0,04 mM, die spezifische Aktivität 440 Ci/mol. Bei einer Glucosekonzentration von 3 mM, bei der die Insulinsekretion nicht stimuliert wird, ergab sich ein Gehalt an ^{45}Calcium von 0,461 pmol pro 10 Inseln. Die Steigerung der Glucosekonzentration auf 20 mM führte zu einer signifikanten Erhöhung des Calciumgehaltes auf 1,137 pmol pro 10 Inseln.

4.2 Einfluß von tertiärem Butylhydroperoxid auf die glucoseinduzierte Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte.

Ammon und Mitarbeiter fanden (1977), daß t.-BHP in einer Konzentration von 2 mM die durch Glucose induzierte

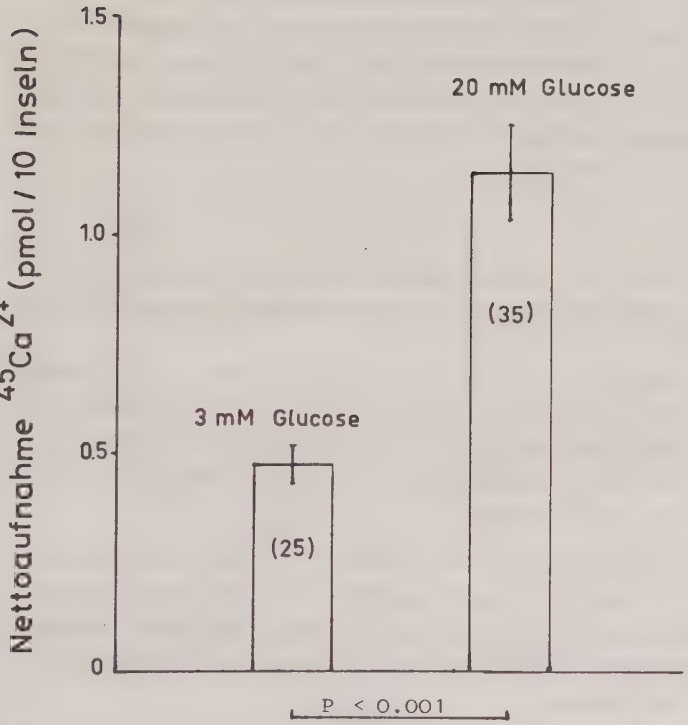
Tabelle 1: Einfluß von Glucose 3 mM und 20 mM sowie von Glucose 20 mM + t.-BHP 2 mM und von Glucose 20 mM + Diamid 0,1 mM auf die Nettoaufnahme von ^{45}Calcium in Langerhanssche Inseln von Ratten.

Glucose	Calciumaufnahme (pmol/10 Inseln)			
3 mM	0,461	± 0,048	(25)	A
20 mM	1,137	± 0,110	(35)	B
20 mM + 2 mM t.-BHP	0,657	± 0,081	(16)	C
20 mM + 0,1 mM Diamid	0,588	± 0,073	(17)	D

Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
0,04 mM Calcium, spez. Aktivität 440 Ci/mol
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-Test: AB: $P < 0.001$ BC: $P < 0.01$ BD: $P < 0.01$

IN VITRO EFFEKT VON GLUCOSE AN RATTENINSELN

Parameter: Calciumaufnahme



Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
0,04 mM Calcium, spez. Aktivität 440 Ci/mol
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-Test

Abb. 14

Insulinsekretion hemmt, und sie wiesen (1979) nach, daß durch 2 mM t.-BHP der Gehalt an reduziertem Glutathion in den Inseln gesenkt wurde.

In der Abbildung 15 und Tabelle 1 ist nun der Einfluß von 2 mM t.-BHP auf die durch Glucose gesteigerte Aufnahme von ^{45}Calcium in die Langerhanssche Insel dargestellt. Dabei zeigt sich, daß t.-BHP in der verwendeten Konzentration auch die Aufnahme von ^{45}Calcium in die Insel signifikant hemmt. Die Nettoaufnahme an ^{45}Calcium wurde von 1,137 pmol pro 10 Inseln auf 0,657 pmol pro 10 Inseln gesenkt. Die Calciumkonzentration im Medium betrug 0,04 mM bei einer spezifischen Aktivität von 440 Ci/mol.

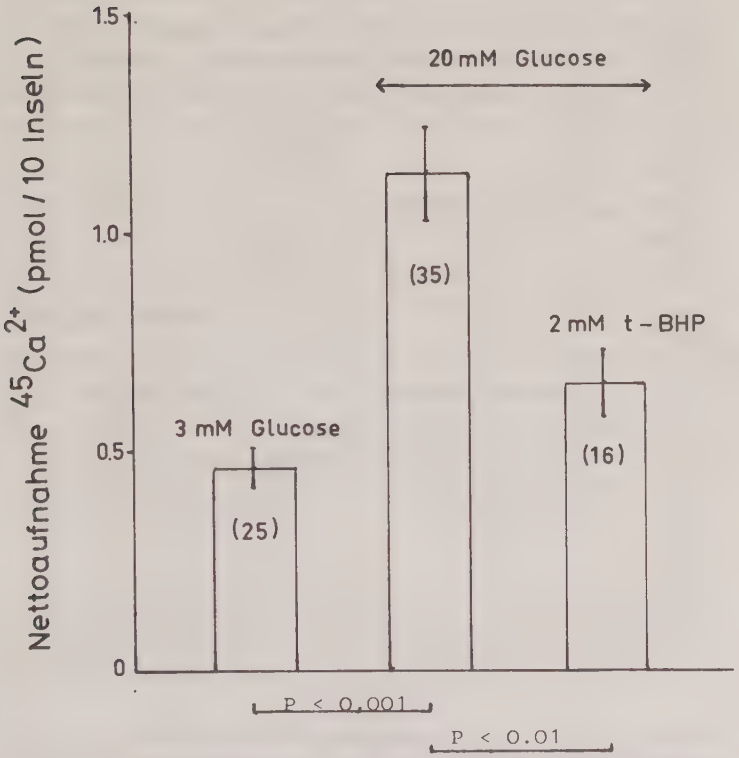
4.3 Einfluß von Diamid auf die glucoseinduzierte Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte.

Auch Diamid, in einer Konzentration von 0,1 mM, hemmt die durch 16,7 mM Glucose induzierte Insulinsekretion und senkt ebenfalls die intrazellulären GSH-Werte isolierter Langerhansscher Inseln von Ratten (Ammon et al., 1977, 1979).

In der Abbildung 16 und Tabelle 1 sieht man den Einfluß von 0,1 mM Diamid auf die durch Glucose induzierte Calciumaufnahme. Es zeigt sich eine signifikante Hemmung von 1,137 pmol pro 10 Inseln auf 0,588 pmol pro 10 Inseln.

IN VITRO EFFEKT VON TERT.-BUTYL-HYDROPEROXID AN RATTENINSELN

Parameter: Calciumaufnahme



Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min, 0,04 mM Calcium, spez. Aktivität 440 Ci/mol

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mean ± SEM

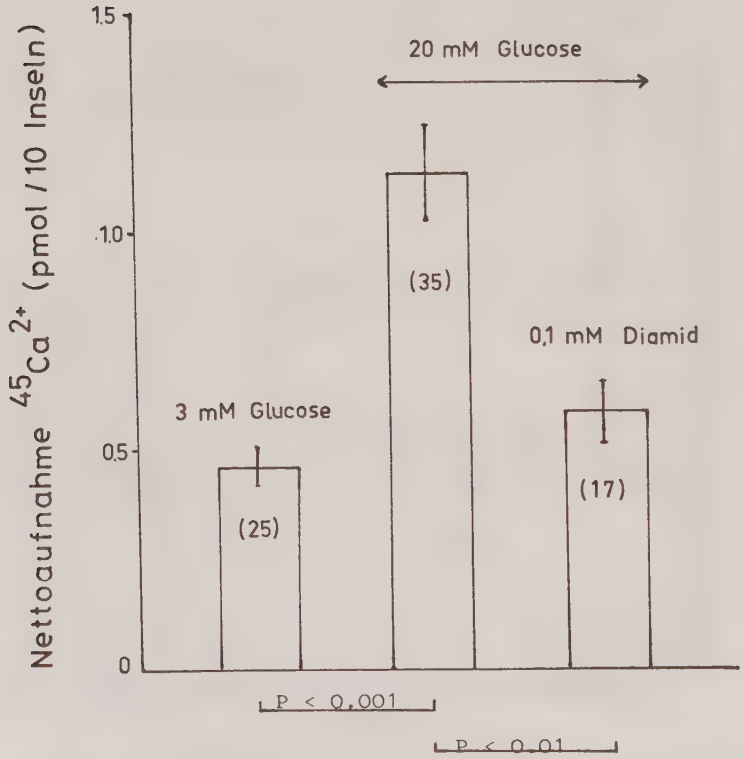
t-Test

Abb. 15

IN VITRO EFFEKT VON DIAMID

AN RATTENINSELN

Parameter : Calciumaufnahme



Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
0,04 mM Calcium, spez. Aktivität 440 Ci/mol

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mean ± SEM

t-Test

Abb. 16

4.4 Einfluß von verschiedenen Glucosekonzentrationen auf die Aufnahme von ^{45}Calcium in Langerhanssche Inseln der Ratte, bei einer Calciumkonzentration von 2,6 mM im Inkubationsmedium.

Da nach den Vorversuchen 4.1 bis 4.3 die Intaktheit der Meßmethode bezüglich der Bestimmung des Lanthan-non-displaceable Calciums bei hoher spezifischer Aktivität und geringer Calciumkonzentration im Medium bestätigt war, wurde die Glucoseabhängigkeit der Calciumaufnahme auch bei physiologischen Calciumkonzentrationen im Inkubationsmedium nachgewiesen.

Dazu wurde der Einfluß von 3 mM und 20 mM Glucose auf die Aufnahme von Lanthan-non-displaceable Calcium in isolierte Pankreasinseln bei einer Calciumkonzentration von 2,6 mM gemessen. Die spezifische Aktivität verringerte sich dadurch auf 7,8 Ci/mol.

In der Abbildung 17 und der Tabelle 2 zeigt sich, daß die Erhöhung der Glucosekonzentration von 3 auf 20 mM auch unter diesen Bedingungen zu einer signifikanten Steigerung der Calciumaufnahme von 45,86 fmol pro 10 Inseln auf 104,77 fmol pro 10 Inseln führt.

4.5 Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte.

Nach dem gleichen Versuchsaufbau wurde nun die Insulinsekretion bei 3 mM und 20 mM Glucose bestimmt, da die Ergebnisse der Calciumaufnahmemessungen mit der Insulinsekretion in Beziehung stehen. Es mußte daher geklärt werden, ob unter den gegebenen Bedingungen und mit den beschriebenen Geräten eine Insulinsekretion

Tabelle 2: Einfluß von Glucose 3 mM und 20 mM auf die Nettoaufnahme von ^{45}Calcium in Langerhanssche Inseln von Ratten.

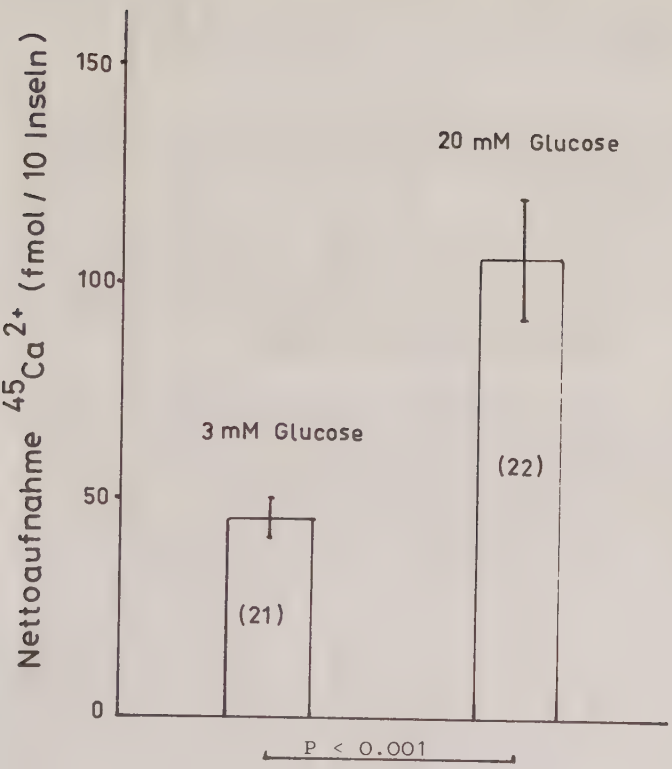
Glucose	Calciumaufnahme (fmol/10 Inseln)				
3 mM	45,86	±	4,55	(21)	A
20 mM	104,77	±	14,73	(22)	B

Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
2,6 mM Calcium, spez. Aktivität 7,8 Ci/mol
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-Test: AB: $P < 0.001$

IN VITRO EFFEKT VON GLUCOSE

AN RATTENINSELN

Parameter : Calciumaufnahme



Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
2,6 mM Calcium, spez. Aktivität 7,8 Ci/mol
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-Test

Abb. 17

bei 20 mM Glucose im Medium erfolgt. Die Calciumkonzentration im Medium betrug 2,6 mM.

Bei nicht stimulierender Glucosekonzentration von 3 mM ergab sich, wie Tabelle 3 und Abbildung 18 zeigen, ein Basalwert an Insulin im Medium von 100,8 µE pro 10 Inseln. Die Proben, die mit 20 mM Glucose inkubiert worden waren, ergaben eine signifikante Steigerung der Insulinsekretion auf 212,9 µE pro 10 Inseln.

4.6 Einfluß von DIP und DIP-Salz auf die Calciumaufnahme isolierter Pankreasinseln der Ratte.

4.6.1 Einfluß von DIP auf die Calciumaufnahme isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte unter einer die Insulinsekretion stimulierenden Glucosekonzentration.

Eujen hatte (1979) festgestellt, daß DIP in einer Konzentration von 0,1 mM den GSH-Gehalt der Langerhansschen Inseln in Gegenwart von 16,7 mM Glucose senkt, und Kilgus fand (1981), daß 0,1 mM DIP die Insulinsekretion des perfundierten Pankreas in Gegenwart von 16,7 mM Glucose ebenfalls hemmt.

Abbildung 19 und Tabelle 4 zeigen nun den Einfluß von DIP auf die Calciumaufnahme isolierter Pankreasinseln bei 20 mM Glucose. Dabei senkt DIP die durch Glucose gesteigerte Calciumaufnahme dosisabhängig von 0,025 mM bis 0,1 mM.

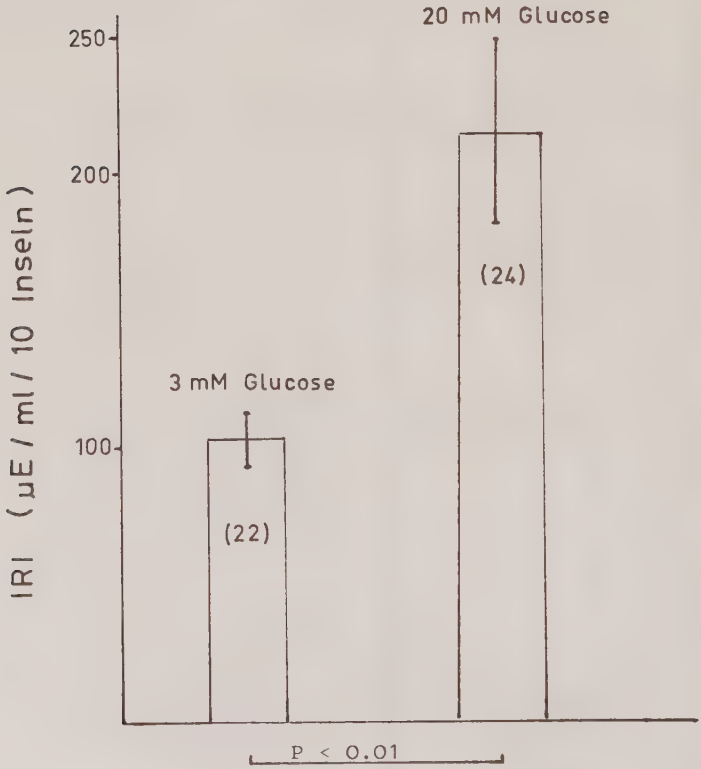
Tabelle 3: Einfluß von Glucose 3 mM und 20 mM auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln von Ratten.

Glucose	Insulinsekretion (µE IRI/10 Inseln)			
3 mM	100,8	± 10,9	(22)	A
20 mM	212,9	± 35,4	(24)	B

Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min, mit 2,6 mM Calcium
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-Test: AB: $P < 0.01$

IN VITRO EFFEKT VON GLUCOSE AN RATTENINSELN

Parameter: Insulinsekretion



Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min, 2,6 mM Calcium

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mean ± SEM

t-Test

Abb. 18

Tabelle 4: Einfluß von DIP in einer Konzentration von 0 bis 0,1 mM auf die durch 20 mM Glucose hervorgerufene Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von Ratten.

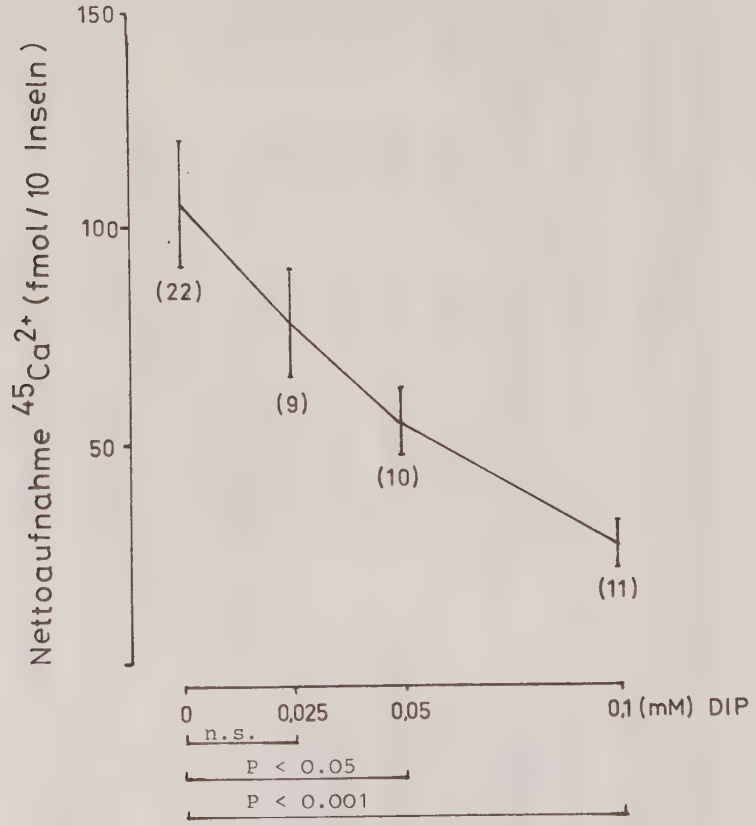
Glucose 20 mM	Calciumaufnahme (fmol/10 Inseln)			
+ DIP 0 mM	104,77	± 14,73	(22)	A
+ DIP 0,025 mM	77,11	± 13,23	(9)	B
+ DIP 0,05 mM	54,10	± 8,30	(10)	C
+ DIP 0,1 mM	26,18	± 5,34	(11)	D

Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
2,6 mM Calcium, spez. Aktivität 7,8 Ci/mol
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-test: AB: n.s. AC: $P < 0.05$ AD: $P < 0.001$

IN VITRO EFFEKT VON DIP AN RATTENINSELN

IN GEGENWART VON 20 mM GLUCOSE

Parameter: Calciumaufnahme



Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
2,6 mM Calcium, spez. Aktivität 7,8 Ci/mol

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mean ± SEM

t-Test

Abb. 19

4.6.2 Einfluß von DIP auf die Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte unter einer die Insulinsekretion nicht stimulierenden Glucosekonzentration.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß DIP dosisabhängig die gesteigerte Calciumaufnahme bei 20 mM Glucose hemmt, sollte der Effekt dieses Thioloxidans auf die basale Calciumaufnahme in Gegenwart von 3 mM Glucose untersucht werden.

Die Tabelle 5 und die Abbildung 20 zeigen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe. Es wird deutlich, daß die basale Calciumaufnahme, die bei der β-Zelle in inaktiviertem Zustand erfolgt, durch DIP in keiner der eingesetzten Konzentrationen signifikant verändert wird.

4.6.3 Einfluß von DIP-Salz auf die Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln unter einer die Insulinsekretion stimulierenden Glucosekonzentration.

Die erhaltenen Ergebnisse mit DIP werfen die Frage auf, ob die Hemmwirkung von DIP auf die gesteigerte Calciumaufnahme der stimulierten β-Zelle aufgrund von Wechselwirkungen mit intrazellulären Thiolen oder mit Membran-SH-Gruppen zustande kommt. Darüber hinaus könnte der beobachtete Effekt die Resultante beider Wirkungen darstellen, denn Kosower und Mitarbeiter (1974) sowie Kosower und Kanety-Londner (1976) zeigten, daß DIP die Zellmembran rasch permeiert und Glutathion zu oxidieren vermag.

Um diese Frage zu klären, wurde nun das polare DIP-Salz eingesetzt, das die Zellmembran während der ge-

Tabelle 5: Einfluß von DIP in einer Konzentration von 0 bis 0,1 mM auf die durch 3 mM Glucose hervorgerufene Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von Ratten.

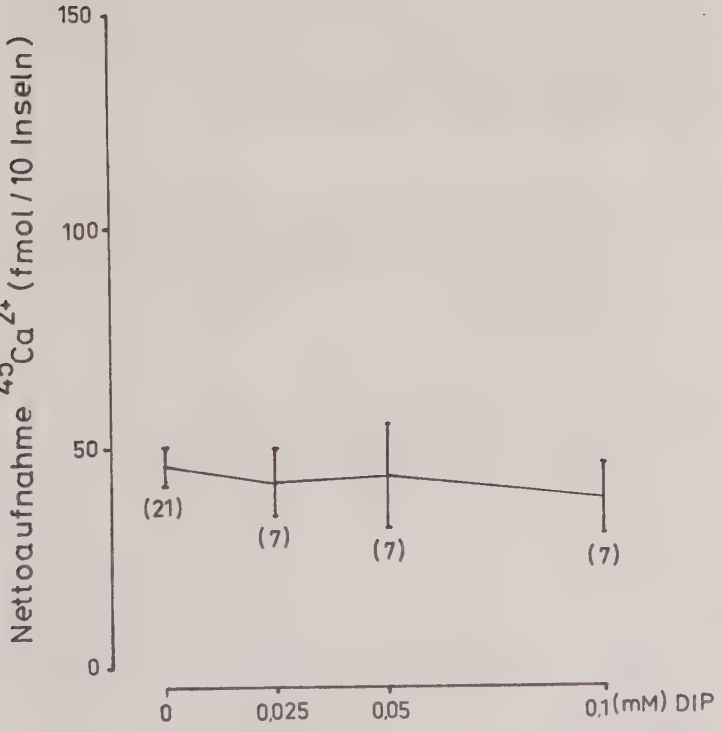
Glucose 3 mM	Calciumaufnahme (fmol/10 Inseln)			
+ DIP 0 mM	45,86	± 4,55	(21)	A
+ DIP 0,025 mM	42,29	± 8,29	(7)	B
+ DIP 0,05 mM	43,43	± 11,67	(7)	C
+ DIP 0,1 mM	50,43	± 8,74	(7)	D

Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
2,6 mM Calcium, spez. Aktivität 7,8 Ci/mol
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-Test: n.s.

IN VITRO EFFEKT VON DIP AN RATTENINSELN

IN GEGENWART VON 3 mM GLUCOSE

Parameter: Calciumaufnahme



Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
2,6 mM Calcium, spez. Aktivität 7,8 Ci/mol

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mean ± SEM

t-Test: n.s.

Abb. 20

wählten Inkubationszeit nicht zu durchdringen vermag (Kosower et al., 1974) und somit intrazellulär Glutathion nicht oxidieren kann (Eujen, 1979).

Tatsächlich zeigt sich in Abbildung 21 und Tabelle 6, daß DIP-Salz im Konzentrationsbereich von 0,025 bis 0,1 mM die durch 20 mM Glucose gesteigerte Calciumaufnahme im Gegensatz zu DIP nicht hemmt.

Dieser Befund läßt den Schluß zu, daß die Hemmung der durch Glucose gesteigerten Calciumaufnahme durch DIP keinen Membraneffekt darstellt, sondern über intrazelluläre Mechanismen vermittelt wird.

4.6.4 Einfluß von DIP-Salz auf die Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln unter einer die Insulinsekretion nicht stimulierenden Glucosekonzentration.

Wenn also DIP-Salz keinen Einfluß auf die durch 20 mM Glucose maximal gesteigerte Calciumaufnahme hat, so war als nächste Frage von Interesse, ob die basale Calciumaufnahme bei 3 mM Glucose durch DIP-Salz verändert wird. Befunde von Eujen (1979) an der isolierten Ratteninsel zeigten nämlich, daß DIP-Salz dosisabhängig von 0 bis 0,5 mM die durch 5,5 mM Glucose induzierte Insulinsekretion steigert. Genauso fand Kilgus (1981) beim isoliert perfundierten Rattenpankreas eine signifikant gesteigerte Insulinsekretion bei einer Glucosegabe von 5,5 mM, wenn er DIP-Salz in einer Konzentration von 0,5 mM dem Perfusionsmedium zusetzte.

Die Abbildung 22 und die Tabelle 7 zeigen nun den Einfluß von DIP-Salz auf die Calciumaufnahme isolierter Inseln in Gegenwart von 3 mM Glucose. Man

Tabelle 6: Einfluß von DIP-Salz in einer Konzentration von 0 bis 0,1 mM auf die durch 20 mM Glucose hervorgerufene Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von Ratten.

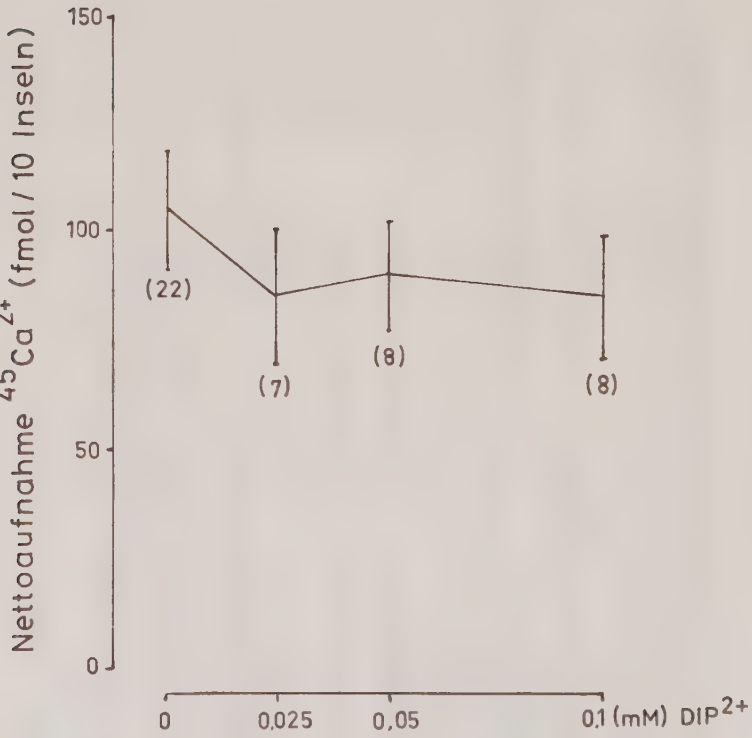
Glucose 20 mM	Calciumaufnahme (fmol/10 Inseln)			
+ DIP-Salz 0 mM	104,77	± 14,73	(22)	A
+ DIP-Salz 0,025 mM	85,00	± 16,11	(7)	B
+ DIP-Salz 0,05 mM	90,25	± 13,18	(8)	C
+ DIP-Salz 0,1 mM	85,75	± 14,26	(8)	D

Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
2,6 mM Calcium, spez. Aktivität 7,8 Ci/mol
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-test: n.s.

IN VITRO EFFEKT VON DIP^{2+} AN RATTENINSELN

IN GEGENWART VON 20 mM GLUCOSE

Parameter: Calciumaufnahme



Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
2,6 mM Calcium, spez. Aktivität 7,8 Ci/mol
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-Test: n.s.

Abb. 21

Tabelle 7: Einfluß von DIP-Salz in einer Konzentration von 0 bis 0,1 mM auf die durch 3 mM Glucose hervorgerufene Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von Ratten.

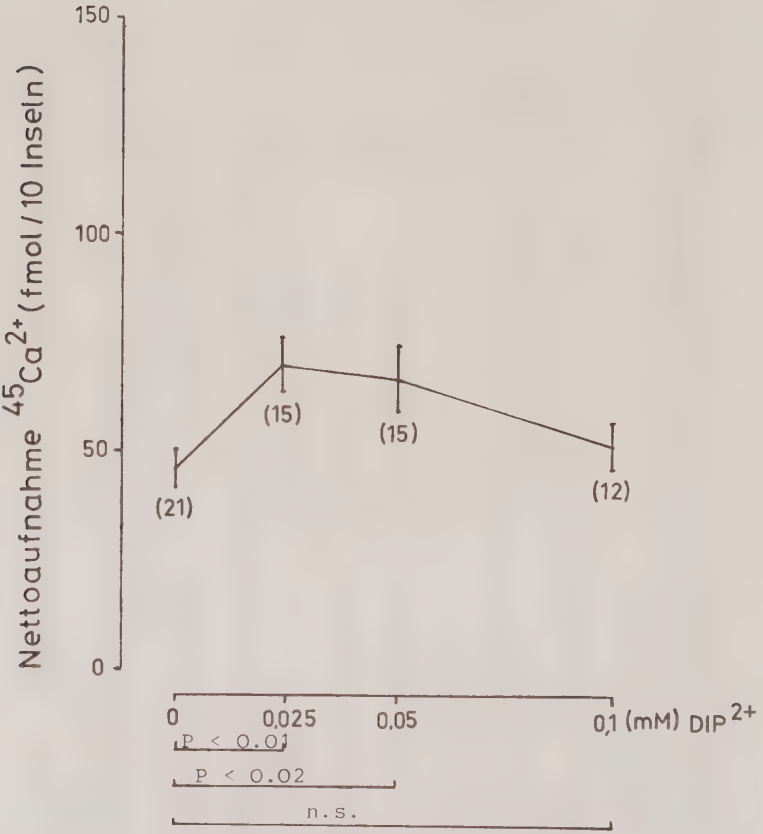
Glucose 3 mM	Calciumaufnahme (pmol/10 Inseln)		
+ DIP-Salz 0 mM	45,86 ± 4,55	(21)	A
+ DIP-Salz 0,025 mM	69,93 ± 6,14	(15)	B
+ DIP-Salz 0,05 mM	66,93 ± 7,60	(15)	C
+ DIP-Salz 0,1 mM	51,25 ± 5,51	(12)	D

Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
2,6 mM Calcium, spez. Aktivität 7,8 Ci/mol
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-Test: AB: $P < 0.01$ AC: $P < 0.02$ AD: n.s.

IN VITRO EFFEKT VON DIP^{2+} AN RATTENINSELN

IN GEGENWART VON 3mM GLUCOSE

Parameter: Calciumaufnahme



Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
2,6 mM Calcium, spez. Aktivität 7,8 Ci/mol

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mean ± SEM

t-Test

Abb. 22

sieht, daß die Nettoaufnahme von Calcium bei 0,05 mM und bei 0,025 mM gegenüber dem Basalwert bei 3 mM Glucose ohne Zusatz von DIP-Salz tatsächlich signifikant gesteigert ist. Diese Steigerung der basalen Calciumaufnahme kommt möglicherweise durch die Reaktion des DIP-Salzes mit membranständigen Thiolgruppen zustande.

4.6.5 Einfluß von DIP plus DIP-Salz in äquimolaren Konzentrationen auf die Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln unter einer die Insulinsekretion nicht stimulierenden Glucosekonzentration.

Ziel folgender Untersuchungen war es nun, einen weiteren Hinweis auf die Zusammenhänge zwischen Membranthiolen, intrazellulärem Glutathionsystem und der Calciumaufnahme zu erhalten.

Sind freie -SH-Gruppen in der Membran der β-Zelle Voraussetzung für eine Steigerung der Calciumaufnahme durch DIP-Salz und werden diese -SH-Gruppen durch das intrazelluläre Glutathionsystem in reduziertem Zustand gehalten, so müßte die beobachtete DIP-Salz-Wirkung auf die Calciumaufnahme durch gleichzeitige Gabe von DIP hemmbar sein, weil dieses intrazellulär Glutathion senkt.

Es wurden die Inseln bei einer substimulatorischen Glucosekonzentration von 3 mM im Medium und zusätzlich äquimolaren Mengen DIP und DIP-Salz inkubiert. Die Ergebnisse zeigen (Tabelle 8, Abbildung 23), daß der durch DIP-Salz hervorgerufene Anstieg der Calciumaufnahme durch DIP-Zugabe gehemmt wird. Diese Befunde lassen vermuten, daß für die Stimulierung

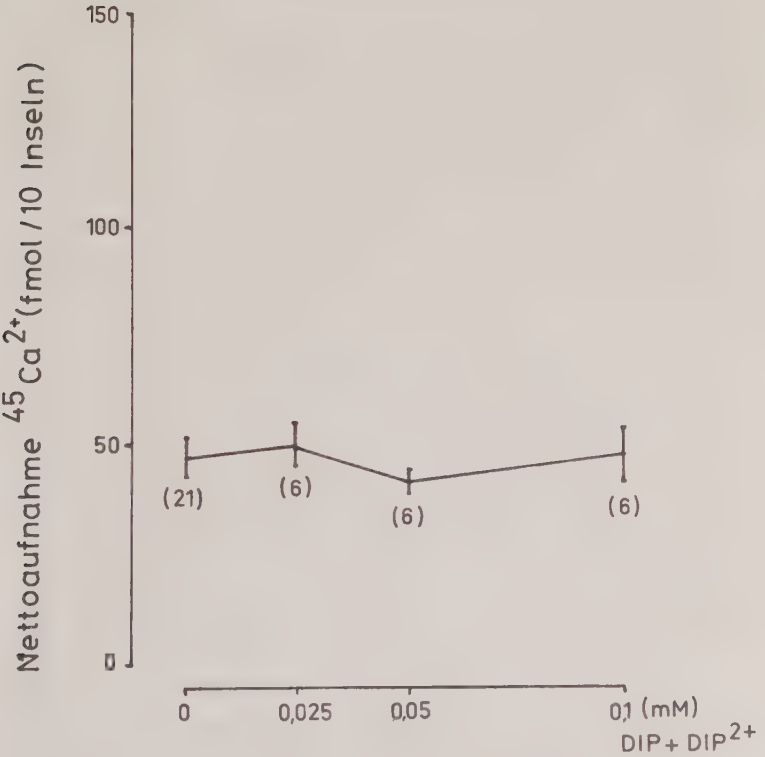
Tabelle 8: Einfluß von DIP + DIP-Salz in äquimolarer Konzentration von 0 bis 0,1 mM auf die durch 3 mM Glucose hervorgerufene Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln von Ratten.

Glucose 3 mM	Calciumaufnahme (fmol/10 Inseln)			
+ DIP + DIP-Salz 0 mM	45,86	± 4,55	(21)	A
+ DIP + DIP-Salz 0,025 mM	50,50	± 5,19	(6)	B
+ DIP + DIP-Salz 0,05 mM	41,00	± 2,44	(6)	C
+ DIP + DIP-Salz 0,1 mM	48,33	± 6,23	(6)	D

Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min,
2,6 mM Calcium, spez. Aktivität 7,8 Ci/mol
Anzahl der Versuche (n) in Klammern
Mean ± SEM
t-Test: n.s.

IN VITRO EFFEKT VON DIP+DIP^{2+} AN RATTEN-INSELN IN GEGENWART VON 3mM GLUCOSE

Parameter: Calciumaufnahme



Inkubation: 20 Inseln in 1 ml Tris-Puffer x 30 min, 0,04 mM Calcium, spez. Aktivität 440 Ci/mol

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Mean ± SEM

t-Test: n.s.

Abb. 23

der basalen Calciumaufnahme durch DIP-Salz ein hoher Redoxstatus des intrazellulären Glutathions notwendig ist.

5. D I S K U S S I O N

5.1 Allgemeines zur Bedeutung des Calciums für die Zellfunktion

5.1.1 Calciumverteilung in der β-Zelle im Ruhezustand

Neben der Calciumhomöostase im Extrazellulärraum, für die das Blutplasma das Regulationszentrum darstellt, existiert in jeder einzelnen Körperzelle ein eigenes Homöostasesystem, das die cytosolische Calciumkonzentration reguliert. Es schützt die Zelle einerseits vor einer Calciumüberschwemmung bei Konzentrationsschwankungen des extrazellulären Calciums, andererseits induziert es für die Zellfunktion wichtige zelluläre Calciumverschiebungen.

Im Cytosol der nicht stimulierten β-Zelle beläuft sich die Konzentration an ionisiertem Calcium auf 10^{-7} bis 10^{-6} M ≙ 0,1 bis 1µM, während extrazellulär etwa 10^{-3} ≙ 1 bis 2,6 mM vorliegen (Montague, 1977). Dieses ionisierte Calcium im Cytoplasma steht im Gleichgewicht mit Calciumfraktionen, die intrazellulär an Depotorganellen gebunden sind. Die höchste Calciumakkumulation zeigen die Mitochondrien, die Insulinlagergranula und die Mikrosomen (Hermann et al., 1973; Schäfer und Klöppel, 1974 a; Howell et al., 1975; Ravazzola et al., 1976). Solche Depotorganellen können Calcium aktiv mit Hilfe von Ionenpumpen akkumulieren, in den Mitochondrien können Calciumsalze in Analogie zum Knochen sogar als Calciumphosphat ausgefällt werden (Christensen, 1969; Carafoli et al., 1975).

Malaisse und Mitarbeiter haben (1978 b) den Gehalt einer Ratteninsel an Calcium aus verschiedenen Ver-

suchsserien extrapoliert und als intrazelluläre Calciummenge bei calciumfreiem Extrazellulärmedium 20 pg pro Insel berechnet.

5.1.2 Calciumfluxe durch Zellmembrane und intrazelluläre Umverteilung

Die freie cytosolische Calciumkonzentration stellt sich als Summe folgender Calciumfluxe dar:

1. Calciuminfluxe durch Zellmembrane (nach Rink et Baker, 1975)
   a) passive Diffusion, dem Konzentrations- und Ladungsgradienten folgend. Dieser Wert beträgt nach Rasmussen (1970) 0,001 bis 0,10 pmol/cm^2/s. Er ist unabhängig vom Erregungsgrad und vom Membranpotential der Zelle.

   b) sog. "früher Calciumeinstrom", ist von einer vorangegangenen Membrandepolarisation abhängig und erfolgt in der Frühphase der Erregung gemeinsam mit dem Natriumeinstrom. Da dieser Calciuminflux mit Tetrodoxin hemmbar ist, wird angenommen, daß er durch den Natrium-Kanal in der Zellmembran erfolgt.

   c) sog. "später Calciumeinstrom", setzt ebenfalls eine Membrandepolarisation voraus und erfolgt zeitlich gegenüber der zweiten Form etwas verzögert. Er stellt den quantitativ bedeutsamsten Calciumeinstrom dar und liefert auch die größeren für die intrazelluläre Funktion notwendigen Calciummengen (Baker et al., 1973 b). Er ist unabhängig vom Tetrodoxin, also vom Natriumkanal getrennt, kann aber durch Calciumantagonisten wie Verapamil (Baker et al., 1973 a), Rutheniumrot und Tetracain (Berridge, 1975) blockiert

werden. Darüber hinaus ist er hemmbar durch zweiwertige Kationen wie Lanthan, Mangan und Kobalt (Baker et al., 1973 a), die durch Verdrängung des Calciums von der Glycocalyx an der Aussenseite der Zellmembran diesen Calciumkanal blockieren (Muller und Finkelstein, 1974).

2. Intrazelluläre Umverteilung zwischen Depotorganellen und Cytosol, wobei die Mitochondrien die quantitativ wichtigste Rolle spielen. Sie sind zu einer ausgeprägten Calciumakkumulation entgegen dem Konzentrationsgradienten fähig (Robertson, 1976). Der Calciumtransport in die Mitochondrien ist energieabhängig und geht mit einer ATP-Spaltung einher. Die Mitochondrien erfüllen gegenüber dem Calciumspiegel im Cytoplasma eine wichtige Regulator- und Depotfunktion.

3. Calciumeffluxe durch Zellmembrane
Alle diese Vorgänge stellen einen Calciumtransport entgegen dem elektrischen und chemischen Gradienten dar, der in der Regel nur durch einen energieverbrauchenden Prozeß möglich ist.
   a) entspricht dem ersten Mechanismus des Calciumeinstroms an der ruhenden Zelle. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um einen einfachen Calciumaustausch, wobei ein eintretendes Calciumion durch ein austretendes ausgetauscht wird (Rink et Baker, 1975).

   b) Dieser Efflux besteht in einem Austausch von Natrium und Calcium, wobei für drei in die Zelle einströmende Natriumatome ein Calciumatom nach dem Drehtürenprinzip gegen den elektrochemischen Gradienten aus der Zelle heraustransportiert wird (Baker et Schlaepfer, 1975; Blaustein, 1974).

c) Dieser Mechanismus besteht aus einer Ca^{2+}- und Mg^{2+}-sensitiven ATP-ase, die unmittelbar auf die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels anspricht (Hurwitz et al., 1973; Schatzmann, 1975; Berridge, 1975). Die halbe Sättigung ihrer Transportaktivität ist schon bei einer Calciumkonzentration von 10^{-6} M erreicht. Die Spaltung eines ATP-Moleküls geht mit dem Transport zweier Calciumatome einher.

d) Der vierte Transporttyp, der sog. "späte Efflux", kommt dadurch zustande, daß mit der Ausschleusung von Sekretgranula beträchtliche Mengen Calcium, die im Granulum eingeschlossen sind, mit ihm die Zelle verlassen (Schäfer und Klöppel, 1974 a und b).

5.1.3 Beziehungen zwischen der Änderung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration und der Insulinsekretion

Hellman und Mitarbeiter schreiben (1971) der Steigerung der Calciumkonzentration im Cytoplasma eine Triggerfunktion bei der Insulinsekretion zu. Auch andere Autoren, wie Malaisse (1973), Sugden und Ashcroft (1978) sowie Frankel und Mitarbeiter (1978) sind der Ansicht, daß eine Steigerung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration Voraussetzung für die Sekretion von Insulin ist.

Über den Mechanismus, mit dem die Glucose als bedeutendster physiologischer Stimulus zur Insulinsekretion führt, gibt es verschiedene Vorstellungen.

Ein auf umfangreichen elektrophysiologischen und biochemischen Versuchen gegründetes hyopthetisches Modell

einer an der Membran ablaufenden Reaktionskette vom Glucose-Stimulus bis zur gesteigerten Calciumkonzentration im β-Zellcytoplasma schlägt Matthews (1975) vor:

Als erster Schritt wird die Glucose zu Glycerinaldehyd metabolisiert. Die hierfür notwendigen Enzyme sind in der Zellmembran lokalisiert. Durch die Aktivität des Schlüsselenzyms Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase, das den nächsten Metabolisierungsschritt katalysiert, wird NAD zu NADH reduziert. Die dadurch hervorgerufene Veränderung des Redoxgleichgewichts und des pH in Membrannähe führt zusammen mit der Zunahme des ATP-Gehalts durch die Aktivität der Phosphoglyceratkinase zu einer Gestalts- und Leitfähigkeitsänderung der Membran, die zu einer Abnahme des Kaliumausstroms aus der Zelle führt. Da das Membranpotential der β-Zelle ein Kalium-Diffusions-Potential darstellt, kommt es zu einer Depolarisation. In der Folge steigt die Calciumpermeabilität in einem potentialabhängigen Calciumkanal sprunghaft an, der plötzliche Calciumeinstrom in die Zelle führt zum Aktionspotential. In der β-Zelle stellt nicht Natrium, sondern Calcium das Trägerion des Aktionspotentials dar (Matthews, 1975).

Dieses Modell vereinigt bis zu einem gewissen Punkt die beiden in der Einleitung erwähnten Theorien, wie die Glucose ihren Sekretionsreiz vermittelt: die Möglichkeit eines Membranrezeptors für Glucose besteht einerseits, wobei andererseits das Signal auch aus dem Glucosemetabolismus stammen kann.

Montague postulierte (1977) zwei Wege, über die die Glucose ihre Stimulation vermittelt:

a) Durch einen "primary stimulus" wie Glucose erfolgt eine rasche Depolarisation der Plasmamembran mit nachfolgender Permeabilitätssteigerung für Calcium

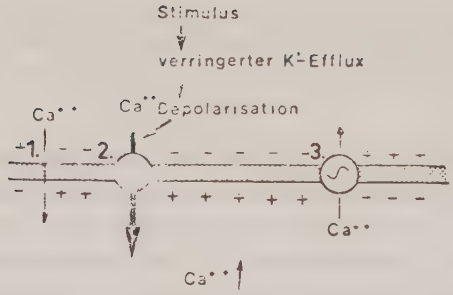


Abb. 24: (aus Schäfer, 1980)
Elektrophysiologische Veränderungen in der β-Zellmembran bei der Aktivierung.
1. Passive Diffusion von Calcium (≙ Influx 1a, siehe Kapitel 5.1.2)
2. Später Calciumeinstrom (≙ Influx 1c, siehe Kapitel 5.1.2; auch Kapitel 1.1.1 A)
3. Früher Calciumefflux (≙ Efflux 3c, siehe Kapitel 5.1.2; auch Kapitel 1.1.1 C)

(Dean und Matthews, 1970). Dadurch nimmt die cytoplasmatische Calciumkonzentration zu und der Triggermechanismus wird wirksam. Ebenfalls zur Membrandepolarisation und somit zur gesteigerten Calciumaufnahme führen hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen.

Wird Calcium mit Hilfe von Ionophor A 23 187, das zweiwertige Ionen unabhängig von Membranmechanismen in die Zelle transportiert (Ashby et Speake, 1975; Sharp, 1975), intrazellulär gesteigert, wird der Triggermechanismus ebenfalls wirksam, er führt aber nur zu einem monophasischen Insulinpeak (Conaway et al., 1976).

Allerdings stellt diese Insulinsekretion keine physiologische Exocytose dar. Hellman nimmt an, daß Ionophore nicht nur den Calciumeinstrom durch die Zellmembran, sondern auch die Freisetzung von Calcium aus Zellorganellen begünstigen (1975 a) und darüber hinaus die intrazelluläre Stabilität der Insulingranula verringern (1975 b).

Insofern sind Ergebnisse von Ionophoruntersuchungen nur schwer auf physiologische Verhältnisse übertragbar.

b) Durch einen "secondary stimulus", welcher unabhängig vom ersten in der Membran sitzt, wird das cAMP-System in der Membran aktiviert, die Adenylatcyclase-Aktivität nimmt zu, die cAMP-Konzentration steigt intrazellulär an und führt zu einer erhöhten Mobilisierung von Calcium aus den Mitochondrien. Dies kann unabhängig vom Erststimulus und dem Calciuminflux erfolgen. Allerdings ist die Anwesenheit von Glucose zum Insulin-Sekretionsmechanismus notwendig, denn eine alleinige cAMP-Steigerung führt nicht zu einer Erhöhung der Insulinsekretion (Malaisse, 1973; Lacy, 1975; Cerasi, 1975). Die gesteigerte Calciumkonzentration im Cytosol wird sofort durch einen vermehrten Calciumefflux durch die Zellmembran ausgeglichen (Brisson et al., 1972), ohne daß sie eine Triggerfunktion ausübt.

Die cAMP-Wirkung auf die Rückverteilung von Calcium aus Depotorganellen ist allerdings insofern wichtig, als sowohl Glucose (Grill et Cerasi, 1975), wie auch Sulfonylharnstoffe (Charles et al., 1976) zu einer Aktivierung des Adenylatcyclasesystems führen. So könnten Sulfonylharnstoffe ihren Wirkungsmechanismus in einer Steigerung der cAMP-Konzentration haben, entweder in einer Aktivierung der Ade-

nylatcyclase (Kuo et al., 1973) oder in einer Hemmung der Phosphodiesterase (Ashcroft et al., 1972) oder in beidem.

Neben diesen beiden Modellen zum Ablauf der Stimulations-Sekretionskette nach Glucosegabe muß noch auf die weitere Beteiligung des Glucosemetabolismus an diesen Vorgängen eingegangen werden.

Sugden und Ashcroft (1977 und 1978) verteten die Ansicht, daß Phosphoenolpyruvat, ein späteres Glykolyseprodukt, einen möglichen Stimulus für die Insulinsekretion darstellt. Sie haben gezeigt, daß der Inselgehalt an Phosphoenolpyruvat mit der Menge an Insulin korreliert werden kann, die nach Gabe von Glucose und Glycerinaldehyd sezerniert wird. Phosphoenolpyruvat scheint danach die Steigerung der cytosolischen Calciumkonzentration dadurch hervorzurufen, daß es die Calciumaufnahme in die Mitochondrien hemmt.

5.2 Versuche zur Optimierung des Versuchsablaufes bei der Bestimmung von Calcium in Langerhansschen Inseln.

5.2.1 Modifizierung der von Hellman (1978) beschriebenen "Lanthanmethode" zur Bearbeitung der gegebenen Fragestellung: Bedeutung von Thiolgruppen für transmembrane Calciumfluxe

5.2.1.1 Allgemeines zu dieser Methode

Die Problematik der Calciumbestimmung und der Interpretation der Ergebnisse besteht darin, daß das Calciumion die Eigenschaft hat, sich unspezifisch an verschiedenste organische Moleküle zu binden. Es ist deshalb schwierig zu unterscheiden, ob Messungen von Calcium-

aufnahme und -abgabe die charakteristische Transportkinetik der Plasmamembran wiederspiegeln oder nur die Affinität zu intra- und extrazellulären Phasen.

Zur Lösung dieses Problems wurde von van Breemen und Mitarbeitern (1972) La^{3+} benutzt, um extrazelluläres Calcium zu verdrängen und transmembrane Calciumfluxe zu blockieren. Diese an der glatten Muskelfaser durchgeführten Experimente wurden von Chandler und Williams (1974) auf Versuche an Pankreasfragmenten der Maus übertragen.

Schließlich haben Hellman und Mitarbeiter (1976) eine Methode ausgearbeitet, die diese Erkenntnis an mikrodissezierten Pankreasinseln der ob-ob-Maus anwendet.

Lanthan hemmt den Calciumtransport kompetitiv, d.h. alle Calciumströme durch die Membran, Influxe und Effluxe (siehe Abb. 24), werden unterbunden. Diese Fähigkeit wird durch den ähnlichen Ionenradius beider Ionen und der höheren Ladung des Lanthans bedingt. Aufgrund seiner somit höheren Ladungsdichte hat Lanthan eine höhere Affinität zu den Calciumbindungsstellen an der Membranaussenseite und blockiert dadurch transmembrane Calciumfluxe.

Durch die Einführung einer einstündigen Inkubation in La^{3+}-haltigem Medium sofort nach der Hauptinkubation wird extrazellulär anhaftendes Calcium verdrängt (sog. Lanthan-displaceable Calcium) und es wird verhindert, daß das während der Hauptinkubation aufgenommene Calcium nicht während der Spülvorgänge bis zur Calciumbestimmung die Zelle wieder verlassen kann (sog. Lanthan-non-displaceable Calcium).

In einer weiteren Arbeit modifizierte Hellman die Lanthanwaschtechnik dahingehend, daß er die Lanthaninkubation bei $1^{o}C$ durchführte (1978). Er konnte zeigen,

daß die Senkung der Mediumstemperatur auf 1°C zu einer Steigerung des Lanthan-non-displaceable Calciums, das nach Glucosegabe aufgenommen wird, führt. Er interpretiert diesen Effekt dahingehend, daß der Calciumefflux aus der β-Zelle als energieabhängiger Prozeß gegen den Konzentrationsgradienten bei dieser Temperatur zum Erliegen kommt, da kein Substrat mehr zur Verfügung gestellt werden kann (Hellman, 1978).

Aufbauend auf diese Befunde wurde die vorliegende Methode aufgestellt. Dabei wurde im Gegensatz zu Hellman, der mit der Lanthantechnik beide Calciumpools bestimmt, den "displaceable" und den "non-displaceable", nur die Calciummenge bestimmt, die nach der Lanthanfixierinkubation intrazellulär meßbar ist.

Über die Rolle, die die einzelnen Calciumpools bei der Insulinsekretion spielen, haben Hellman und Mitarbeiter in verschiedenen Arbeiten berichtet (Hellman et al., 1976; Bloom et al., 1977; Hellman et al., 1977; Hellman 1978; Hellman et Gylfe, 1978; Hellman et al., 1978). Es zeigt sich, daß der Lanthan-displaceable-Pool methodisch sehr schwer faßbar ist. Seine Glucoseabhängigkeit läßt sich nur nachweisen, wenn der Beladungsinkubation eine kurze Spülinkubation in nicht radioaktivem Medium folgt. Dies hat den Sinn, Mediumsreste und völlig unspezifisch anhaftendes Calcium zu entfernen. Dabei zeigt sich allerdings, daß innerhalb von 1 Minute schon ca. 50 % dieses Pools ausgewaschen werden. Ohne Waschung in nicht radioaktivem Medium ist der displaceable Pool bei 3 und 20 mM Glucose während der Hauptinkubation gleich. Hellman und Gylfe schließen (1978) daraus, daß nur ein kleiner Teil dieses Calciumpools am Sekretionsmechanismus beteiligt ist. Nur dieser Teil, der nach Hellman in der Membran lokalisiert sein muß, hat seiner Meinung nach eine ausreichende Mobilität, um für die

raschen Calciumkonzentrationsänderungen, die nach Glucosegabe erfolgen, sorgen zu können (Hellman et al., 1976 b).

Der Lanthan-non-displaceable Pool, den Hellman dem Granulacalcium zuordnet, wird durch Stoffe gesteigert, die auch die Insulinsekretion stimulieren (D-Glucose, D-Mannose, L-Leucin, Tolbutamid). Allerdings besteht zwischen der Calciumaufnahme nach Gabe von D-Mannose, L-Leucin und Tolbutamid und der daraufhin sezernierten Insulinmenge keine direkte Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die Menge an aufgenommenem Calcium entspricht zwar der nach maximaler Glucosestimulation aufgenommenen, jedoch ist die Sekretionsantwort wesentlich geringer (Hellman et al., 1977). Die Calciumaufnahme in den Lanthan-non-displaceable Pool wird durch Stoffe gehemmt, die auch die Insulinsekretion hemmen (D-Mannoheptulose, Diazoxid, l-Adrenalin) (Malaisse-Lagae et Malaisse, 1971; Hellman et al., 1977). Die Abhängigkeit dieser Calciumaufnahme von der Glucosekonzentration ist darüber hinaus der Glucoseabhängigkeit der Insulinsekretion sehr ähnlich (Hellman et al., 1973).

Aufgrund dieser Befunde scheint zumindest bei der Glucose eine direkte Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Lanthan-non-displaceable Calciumpool und der Insulinsekretion zu bestehen. Da dieser Pool wesentlich sicherer bestimmbar ist und seine Glucoseabhängigkeit in einem weiten Bereich von extrazellulären Calciumkonzentrationen gesichert ist (Hellman et al., 1977), wurde seine Bestimmung für die hier zu bearbeitenden Fragestellungen zugrunde gelegt.

5.2.1.2 Spezielle Waschverfahren zur Backgrounderniedrigung bei der ^{45}Calciummessung

Die Bestimmung des aufgenommenen ^{45}Calciums nach der Lanthanwaschung im Flüssigkeits-Szintillationszähler ist unproblematisch, da ^{45}Calcium als starker ß-Strahler von Quencheffekten nahezu unbeeinflußt und ohne Eichkurve mit einem jeweils mitzumessenden internen Standard bestimmbar ist.

Schwierigkeiten bestehen jedoch darin, das Inselmaterial ohne Verunreinigung durch anhaftende radioaktive Mediumsreste ins Zählgläschen zu bringen, da diese Reste einen zu großen Wert im Bezug auf den Inselgehalt aufweisen. Zum raschen und sicheren Versuchsablauf wurden die Inseln in einem mit Nylonnetz verschlossenen Reaktionsgefäß in das jeweilige Medium eingetaucht und danach auf dem Nylonnetz liegend ins nächste Medium weitertransportiert.

Vor der Zählung im ß-Counter mußten nun Netz und Inselmaterial wieder von einander getrennt werden, da sich gezeigt hatte, daß die Netzbackgrounds bei gemeinsamer Messung mit dem Inselgewebe zu stark schwankten und eine sichere Bestimmung des reinen Inselcalciumgehaltes erschwert wurde. Eine mechanische Trennung der Inseln vom Netz gelingt nicht, da die Oberfläche des Gewebematerials sich mit dem Nylongeflecht verhakt. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, daß die auf das Netz aufgebrachten Inseln nach der gesamten Inkubationsprozedur ihre Lage auf der Netzfläche nicht mehr verändern. Deshalb wurde das Inselmaterial mit dem Nylonnetz zusammen in ein Gläschen übergeführt und mit Hyamin aufgelöst. Danach konnte es durch mechanische Schüttelvorgänge vom Nylonnetz abgespült werden. Nach Trennung von Überstand und Netzblättchen wurde der Calciumgehalt des Überstandes be-

stimmt. Trotzdem mußte ein Leerwert mit Netzen ohne Inseln bestimmt werden, da sich durch das Hyamin und die Schüttelvorgänge im Szintillatorcocktail Radioaktivität vom Nylonnetz ablöste. Allerdings waren diese Backgroundwerte nun sehr klein und schwankten in geringen tolerierbaren Grenzen.

Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt aus den cpm-Messungen mit Hilfe des internen Standards und der Firmenangabe über die Markierung der verwendeten ^{45}Calciumchloridlösung (siehe Kapitel 3.7). Die so erhaltenen molaren ^{45}Calciummengen sind nicht unbedingt repräsentativ für die Gesamtcalciumaufnahme, da nach 30 Minuten das radioaktive Gleichgewicht zwischen Medium und Inseln noch nicht erreicht sein dürfte. Ribes und Mitarbeiter (1981) sind der Ansicht, daß sich dieses Gleichgewicht erst nach 24 Stunden Vorinkubation einstellt. Allerdings kann aus dem Vergleich von verschiedenen ^{45}Calciummengen, die nach derselben Zeit bestimmt wurden, eine Aussage über den Calciumgehalt gemacht werden.

Die Ergebnisse müssen daher immer als Veränderungen des Nettocalciumeinstroms im Vergleich zu einer Kontrolle interpretiert werden.

5.2.1.3 Optimierung der Inkubationszeiten, die zur Ermittlung der Aufnahme meßbarer Calciummengen in der Insel notwendig waren.

Die Inkubationszeiten der Versuchsserien wurden aufgrund folgender Überlegungen festgelegt:

Hellman und Mitarbeiter (1976 b) haben die Abhängigkeit der Calciumaufnahme in den Lanthan-non-displaceable Pool von der Inkubationszeit untersucht. Vergleicht man die Aufnahme in Gegenwart von 3 mM Glu-

cose mit der Aufnahme in Gegenwart von 20 mM Glucose, so zeigt sich, daß die Differenz beider Calciummengen nach 5 Minuten Inkubationszeit am größten ist. Bis 60 Minuten Inkubationszeit ist sie statistisch signifikant und wird bis 90 Minuten Inkubationszeit immer geringer. Aus diesem Befund ergab sich die Notwendigkeit, eine Inkubationszeit von unter 60 Minuten zu wählen.

Nach 5 Minuten Inkubationszeit, bei der die Steigerung der Calciumaufnahme durch 20 mM Glucose gegenüber 3 mM am deutlichsten meßbar ist, ist die sezernierte Insulinmenge noch so gering, daß sie radioimmunologisch nicht meßbar ist. Da die Calciumaufnahme aber mit der Insulinsekretion in enger Beziehung steht, wurde eine Inkubationszeit gewählt, nach der die Insulinsekretion meßbare Größen erreicht.

Man muß sich bei dem gewählten Versuchsmodell der Inkubation isolierter Inseln im klaren sein, daß es sich um ein statisches System handelt. Das bedeutet, daß der gemessene intrazelluläre ^{45}Calciumgehalt nach einer bestimmten Inkubationszeit die momentanen Verhältnisse zu diesem Zeitpunkt wiederspiegelt, während die Insulinbestimmung im Medium nach derselben Zeit die Summe des sezernierten Insulins während der gesamten Inkubationsperiode darstellt. Insofern dürfen beide Werte in der Interpretation nicht direkt korreliert werden.

Der Aspekt der Anreicherung des sezernierten Insulins im Inkubationsgefäß mußte bei der Wahl der Inkubationszeit berücksichtigt werden. Eine eintretende feed-back Hemmung des freigesetzten Insulins auf die weitere Sekretion könnte eventuell eine Rolle spielen (Frerichs et al., 1965; Iversen et Miles, 1971; Rapaport et al., 1972). In der Tat lassen Beobachtungen

in unserem Arbeitskreis (unveröffentlichte Befunde) vermuten, daß exogenes Insulin dosisabhängig auch die durch Glucose induzierte Calciumaufnahme hemmt. Bei der gewählten Inselmenge von 20 Ratteninseln pro 1 ml Inkubationsmedium dürfte dieses Phänomen in den ersten 30 Minuten Inkubationszeit noch nicht zum Tragen kommen.

So wurde unter Berücksichtigung aller oben genannten Befunde eine Inkubationszeit von 30 Minuten gewählt.

5.2.1.4 Änderung der Mediumskonzentration an Calcium und daraus resultierende Änderung der spezifischen Aktivität

Die spezifische Radioaktivität wurde in den Vorversuchen sehr hoch gewählt, 440 Ci/mol Calcium. Dies wurde dadurch erreicht, daß die Calciumkonzentration im Medium auf 0,04 mM gesenkt wurde. Hellman und Mitarbeiter konnten zeigen (1977), daß die glucoseabhängige Steigerung der Calciumaufnahme bei extrazellulären Calciumkonzentrationen von 16 µM bis 2,56 mM nachweisbar ist.

So enthielt das Hauptinkubationsmedium während der Vorversuche fast ausschließlich radioaktiv markiertes Calcium, so daß sich durch das Meßsystem nahezu die gesamte Calciumaufnahme verfolgen ließ. Allerdings ist bei der extrem niedrigen extrazellulären Calciumkonzentration von 0,04 mM die Gesamtcalciumaufnahme nach stimulatorische Glucosegabe sehr gering.

Um dem physiologischen Geschehen aber möglichst nahe zu kommen, wurde für die Versuche, die mit DIP und DIP-Salz durchgeführt wurden, die übliche KRB-Konzentration von 2,6 mM Gesamtcalcium gewählt. Dadurch sank die spezifische Radioaktivität auf 7,8 Ci/mol.

Aufgrund der gewählten Methode zur Calciumbestimmung muß bei der Interpretation aller Meßergebnisse bedacht werden, daß immer die momentane Bilanz aller Calciumfluxe nach 30 Minuten Hauptinkubationszeit bestimmt wird. Dies bedeutet, daß wegen dieser statischen Versuchsanordnung nicht zu unterscheiden ist, ob der gemessene Calciumnettoeinstrom von einem gesteigerten Influx oder von einem gehemmten Efflux herrührt, oder ob er durch beide Mechanismen zustande kommt.

Allerdings kann man aufgrund des durch andere nicht statische Versuchsmodelle (isoliert perfundiertes Pankreas, perifundierte isolierte Inseln) bekannten Sekretionsprofils nach Glucosegabe folgendes schliessen: Nach 30 Minuten Inkubation mit einer stimulatorischen Glucosekonzentration hat der biphasische Insulinsekretionsprozeß sein zweites Plateau erreicht, d.h. die Sekretion ist in vollem Gange. Daraus ergibt sich, daß der sog. "späte Efflux" von Calcium (siehe Kapitel 5.1.1) ebenfalls vollständig abläuft. Die zu diesem Zeitpunkt gemessene Calciumnettoaufnahme müßte somit von einer tatsächlich gesteigerten Aufnahme aus dem Extrazellulärraum stammen und kann nicht durch eine Hemmung des Effluxes hervorgerufen worden sein.

5.3 Membranthiole, Calciumaufnahme und intrazelluläres Glutathionsystem

5.3.1 Intrazelluläre Effekte von t-BHP und Diamid auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln

Wie eingangs erwähnt, spielen Membranthiole beim Transport von Ionen durch die Cytoplasmamembran eine Rolle (Hellman et al., 1974). Die Fähigkeit von Thiolreagen-

tien, die Insulinsekretion zu stimulieren, hängt vom Vorhandensein extrazellulären Calciums ab (Bloom et al., 1972; Hellman et al., 1974; Erlichman et al., 1979). Die Insulinfreisetzung nach pCMB und CMBS ist direkt mit einer gesteigerten Calciumaufnahme korrelierbar.

Von der Überlegung ausgehend, daß Membranthiole mit Hilfe des intrazellulären GSH/GSSG-Redoxsystems in reduziertem Zustand gehalten werden (Rink, 1974), sollte zunächst einmal untersucht werden, ob eine Beziehung zwischen dem Redoxzustand des intrazellulären GSH/GSSG-Systems und der durch Glucose induzierten Calciumaufnahme besteht. Eine solche Verbindung ist insbesondere deshalb denkbar, weil das intrazelluläre Glutathion über den Glucosestoffwechsel in reduziertem Zustand gehalten werden kann. Wird Glucose über den Pentosephosphatweg abgebaut, entsteht NADPH, das seinerseits durch die Oxidation zu NADP GSSG zu GSH reduzieren kann.

Tertiäres Butylhydroperoxid, ein Substrat der Glutathionperoxidase, führt zur Senkung des GSH/GSSG-Quotienten und zur Hemmung der durch Glucose oder pCMB oder Tolbutamid induzierten Insulinsekretion (Ammon et al., 1977 und 1979). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich nun, daß t-BHP auch die durch 20 mM Glucose induzierte Calciumaufnahme hemmt.
Diamid, ein Diazodicarbonsäurederivat, oxidiert GSH zu GSSG und senkt dadurch den intrazellulären Glutathionspiegel. In der Folge hemmt es die durch Glucose oder p-CMB oder Tolbutamid induzierte Insulinsekretion (Ammon et al., 1977 und 1979; Eujen, 1979). Nun wurde gezeigt, daß Diamid auch die durch Glucose induzierte Calciumaufnahme hemmt.

Durch diese Befunde konnte ein weiterer Hinweis er-

bracht werden, daß in der Tat eine Beziehung zwischen dem intrazellulären GSH/GSSG-System und der Calciumaufnahme besteht. Wird nämlich der Gehalt an intrazellulärem GSH durch Hemmstoffe wie t-BHP oder Diamid gesenkt, sinkt auch die durch Glucose induzierte Calciumaufnahme.

Allerdings wirft dieser Befund eine neue Frage auf: Wenn die pharmakologischen Hilfsstoffe, die bisher eingesetzt wurden, über eine Senkung des intrazellulären Glutathions zur Verarmung von Membranthiolen und so zu einer Hemmung der Calciumaufnahme und Insulinsekretion führen, ist nicht auszuschließen, daß der Hemmeffekt auf die Aufnahme von Calcium auf eine direkte Oxidation von Membranthiolen zurückzuführen ist.

Da die extrazellulären Membraneffekte eines in die Zelle eindringenden Stoffes (t-BHP, Diamid) methodisch nicht von seinen intrazellulären Wirkungen zu trennen sind, wurde eine dem Diamid ähnliche Substanz angewendet, die folgende Vorteile hat:

Die Substanz DIP, die dank ihrer Lipophilie die Zellmembran rasch permeiert und intrazellulär mit Glutathion reagiert (Kosower et al., 1974), wurde mit Hilfe von Methyljodid in sein quarternäres Salz übergeführt, das aufgrund seiner Polarität die Zellmembran während der verwendeten Inkubationszeiten nicht mehr zu durchdringen vermag. Somit wurde eine Substanz erhalten, die ihre Reaktionsfähigkeit mit Thiolen nicht verloren hat, da die funktionelle Gruppe R-C=O-N=N-C=O-R unverändert bleibt, aber eventuelle Effekte keine intrazellulären, sondern reine Membraneffekte darstellen. In vitro sind beide Substanzen gleichermaßen in der Lage, Glutathion dosisabhängig zu oxidieren (Eujen, 1979).

Betrachtet man nun zunächst die Wirkung von DIP auf

die durch Glucose induzierte Calciumaufnahme, so zeigt sich, daß sein Effekt dem des Diamids ähnlich ist. Durch die Senkung des intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten wird die Calciumaufnahme gesenkt.

5.3.2 Extrazelluläre Effekte von DIP-Salz an der Langerhansschen Insel in Gegenwart von verschiedenen Glucosekonzentrationen

5.3.2.1 Extrazelluläre Effekte in Gegenwart stimulatorischer Glucosekonzentration von 20 mM

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung von DIP-Salz zu der durch 20 mM Glucose induzierten Calciumaufnahme (siehe 4.5.3) zeigt, daß DIP-Salz, ganz im Gegensatz zu DIP, die Aufnahme von Calcium nicht senkt.

Dieser Befund steht im Einklang mit der beschriebenen Vorstellung, daß die verwendeten pharmakologischen Hilfsstoffe (Diamid, DIP, t-BHP) ihren Hemmeffekt auf die durch Glucose induzierte Calciumaufnahme über die Senkung des intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten vermitteln. Dies stimmt auch mit Befunden aus unserem Arbeitskreis (Eujen, 1979) überein, daß DIP die durch Glucose induzierte Insulinsekretion hemmt, DIP-Salz dagegen nicht. Auf das in der Einleitung (Abb. 2) aufgestellte Stimulationsmodell bezogen, läßt sich daraus schließen, daß Thiolreagentien die Calciumaufnahme und Insulinsekretion nur dann hemmen, wenn sie in der Lage sind, die Zellmembran rasch zu permeieren, intrazelluläres Glutathion zu senken und über diesen intrazellulären Effekt zur Verarmung von Membranthiolgruppen führen. Durch eventuelle extrazelluläre Effekte sind sie nicht in der Lage, die durch Glucose gesteigerte Calciumaufnahme und Insulinsekretion zu hemmen.

5.3.2.2 Extrazelluläre Effekte von DIP-Salz in Gegenwart einer nicht stimulatorischen Glucosekonzentration von 3 mM

Erlichman und Mitarbeiter zeigten (1979) an Hamsterinsulinomzellen, daß organische Quecksilberverbindungen wie pCMB, pCMBS oder Mersalyl die Calciumaufnahme und Insulinsekretion dieser Tumorzellen steigern. Hellman und Mitarbeiter berichteten (1974), daß Stoffe wie pCMB oder pCMBS durch Mercaptidbildung mit membranständigen Thiolen zur Insulinsekretion führen. SH-Reagentien wie DTMB und CPDS induzieren eine Insulinsekretion vermutlich durch Oxidation benachbarter Thiolgruppen zu Disulfidbrücken (Grasetti, 1969).

Aufgrund dieser Befunde stellt sich die Frage, ob das SH-Reagenz DIP-Salz sich ähnlich wie die beschriebenen Reagentien verhält und seinerseits ebenfalls, in Gegenwart nicht stimulierender Glucosekonzentrationen, zur Steigerung der Insulinsekretion und der Caliumaufnahme führt. Eujen konnte (1979) zeigen, daß die Insulinsekretion isolierter Inseln nach Gabe von DIP-Salz ansteigt.

Diese Überlegungen führten zu den Untersuchungen der Calciumaufnahme mit DIP-Salz in Gegenwart von 3 mM Glucose. Die Ergebnisse zeigen, daß DIP-Salz in einer Konzentration von 0,025 und 0,05 mM die basale Calciumaufnahme tatsächlich signifikant steigert.

Dies bedeutet, daß die Wechselwirkung, die das DIP-Salz vermutlich mit Membranthiolen hervorruft, für die Calciumaufnahme und Insulinsekretion einen Stimulus darstellt. Warum dieser Stimulus von der Stärke her nicht mit dem Glucosestimulus vergleichbar ist, könnte seine Erklärung darin finden, daß DIP-Salz aufgrund seiner Konformation nur in geringem Maße Membranthiole erreicht und oxidieren kann. Darüber hinaus spielt die

Möglichkeit eine Rolle, daß bei steigender DIP-Salz-Konzentration geringe Mengen die Zellmembran passieren und intrazellulär Glutathion oxidieren, wie dies am Thiolreagenz Jodacetamid von Hellman und Mitarbeitern (1973) vermutet wird. Dieser Stoff führt in geringer Konzentration zur Insulinsekretion, in hoher aber zur Sekretionshemmung, die möglicherweise auf einer Hemmung der Glycolyse beruht.

Aus diesen Befunden entwickelte sich logischerweise die nächste Fragestellung:

Sind für die Membranwirkung von DIP-Salz freie Thiolgruppen Voraussetzung und werden diese Thiolgruppen durch das intrazelluläre Glutathionsystem in reduziertem Zustand gehalten, dann müßte die DIP-Salz-Wirkung auf die Calciumaufnahme durch gleichzeitige Gabe von DIP hemmbar sein. Die Ergebnisse dieser Versuche, bei denen die Inseln mit DIP und DIP-Salz in äquimolaren Mengen und substimulatorischer Glucose-Konzentration inkubiert wurden, bestätigen diese Erwartung. Für die Stimulierung der Calciumaufnahme durch das nicht permeierende DIP-Salz ist ein hoher Redoxstatus des intrazellulären Glutathions notwendig.

Verbindet man die bisher gemachten Beobachtungen über die Calciumaufnahme mit bekannten Befunden über die Insulinsekretion, läßt sich das in der Einleitung dargelegte Sekretionsmodell (Abb.2) sinnvoll ergänzen:

Glucose, für die Insulinsekretion wichtigster Stimulator und Fuel zugleich, gelangt zunächst in die Zelle und wird verstoffwechselt. Dabei entstehen neben ATP aus Glycolyse und oxidativer Phosphorylierung aus dem PPS vermehrt NADPH. Dieses verschiebt den GSH/GSSG-Quotienten überwiegend auf die reduzierte Seite, das gesteigerte Glutathion kann seine Reduktionsäquiva-

lente an die Zellmembran weitergeben und dort Membran-SH-gruppen in reduziertem Zustand halten oder -S-S-Brücken zu -SH reduzieren. Diese Membran-SH-Gruppen haben auf den Calciumkanal in der Zellmembran einen Einfluß und ermöglichen bei vermehrter Bildung die gesteigerte Calciumaufnahme. Durch die so gesteigerte cytosolische Calciumkonzentration kann der weitere Sekretionsmechanismus anlaufen.

Mit dem Redoxzustand der Membranthiole kann also ein ankommender Stimulus über die Calciumaufnahme reguliert werden: sind SH-Gruppen der Membran mehr auf die reduzierte Seite verschoben, wird ein Stimulus stark wirksam, liegen sie überwiegend oxidiert vor, kann der Stimulus nur schwach wirksam werden.

Das würde bedeuten, daß Stimuli ohne Substrateigenschaften, wie pCMB oder Tolbutamid, nur dann zu einer anhaltenden Insulinsekretion führen, wenn sie zusammen mit Substrat gegeben werden, das für die notwendige Reduktion von oxidierten Membranthiolen sorgt.

Da Tolbutamid oder pCMB die Zellmembran nicht permeieren, ist denkbar, daß sie durch Überführen von -SH in -SS-Brücken oder allgemein durch "Beseitigung" von Thiolen an der ß-Zellmembran ihren Sekretionsreiz vermitteln. Das würde auch die Notwendigkeit laufender "Wiederherstellung" von Membranthiolen durch intrazelluläre Mechanismen erklären.

6. Z U S A M M E N F A S S U N G

6.1 Fragestellung

1. An Langerhansschen Inseln der Ratte wurde die Frage untersucht, wie sich eine Oxidation intrazellulärer und extrazellulärer Thiole auf die Aufnahme von ^{45}Calcium auswirkt und ob sich ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Redoxstatus intrazellulärer und extrazellulärer (Membran-) Thiole nachweisen läßt.
2. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung mußte die von Hellman und Mitarbeitern (1976) und von Hellman (1978) angegebene Methode zur Bestimmung des Lanthan-non-displaceable Calciums eingeführt und modifiziert werden.

6.2 Ergebnisse im methodischen Teil

1. Zur Inkubation kleinster Mengen an Inseln und zur Vermeidung größerer durch Adsorption anhaftender Mengen an ^{45}Calcium an dem Reaktionsgefäß, erwies sich die Verwendung von Polystyrolröhrchen als zweckmäßig, die einseitig mit einem Nylonnetzblättchen verschlossen waren.
2. In Folge der Erhöhung der Calciumkonzentration im Medium von 0,04 mM auf die physiologische Calciumkonzentration von 2,6 mM wurde die spezifische Aktivität des verwendeten Calciums erheblich gesenkt (Hellman, 1978).

   Da die dabei zu erreichenden Zählraten für ^{45}Calcium in den Inseln in der Nähe der durch das Nylonnetz bedingten Background-Zählraten lagen,

mußte durch Einführung eines besonderen Verfahrens zur Trennung des Inselgewebes vom Nylonnetz für eine deutliche Senkung des Backgrounds gesorgt werden. Dies ließ sich erreichen durch:

a) Ultraschallbad der Netze in Äthanol 90 % vor dem Versuch
b) Auflösen des Inselmaterials auf dem Nylonnetz in Hyamin nach der Lanthanfixierinkubation
c) Überführung der Inselradioaktivität in den Cocktail durch Schütteln mit Unisolve I
d) Dekantierung des Unisolve I-Überstandes und somit Trennung vom Nylonnetzblättchen

3. Die Modifikation der Inkubationsdauer (30 min) erlaubte einen Vergleich mit der in dieser Zeit ablaufenden Sekretion von Insulin.

6.3 Versuchsergebnisse

1. Die Erhöhung der Glucosekonzentration von 3 auf 20 mM führte zu einer signifikanten Steigerung der Aufnahme von ^{45}Calcium, sowohl bei einer Mediumskonzentration von 0,04 mM Calcium, als auch bei einer Konzentration von 2,6 mM Calcium.

2. Tertiäres Butylhydroperoxid (2 mM), ein Substrat der Glutathionperoxidase, welches zur Senkung des intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten führt, hemmte die durch 20 mM Glucose hervorgerufene Steigerung der ^{45}Calciumaufnahme.

3. Einen ähnlichen Effekt hatte Diamid, ein Diazodicarbonsäurederivat, das wie t-BHP die Zellmembran permeiert und intrazellulär Glutathion zu oxidieren vermag.

4. Durch Diazodicarbonsäure-N'-(methylpiperazid), einem dem Diamid chemisch verwandten Thioloxidans, das

ebenfalls die Eigenschaft besitzt, Zellmembrane zu permeieren, und das zur Senkung des intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten führt, wurde gleichermaßen die durch 20 mM Glucose gesteigerte Aufnahme von ^{45}Calcium dosisabhängig gesenkt.

5. Das Dijodsalz des Diazodicarbonsäure-N'-(methylpiperazids), welches die Zellmembran nicht permeiert und welches den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten nicht verringert, hemmte die durch 20 mM Glucose gesteigerte ^{45}Calciumaufnahme nicht.

6. In Anwesenheit von nur 3 mM Glucose führte DIP-Salz dagegen selbst zu einer Steigerung der ^{45}Calciumaufnahme, die nach Befunden in unserem Arbeitskreis mit einer Steigerung der Insulinsekretion einhergeht.

7. Die Wirkung von DIP-Salz auf die ^{45}Calciumaufnahme wurde bei gleichzeitiger Anwendung von DIP gehemmt.

6.4 Schlußfolgerung

1. Die durch Glucose stimulierbare Calciumaufnahme in die Langerhanssche Insel ist abhängig vom intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten; im vorliegenden Fall ist sie bei niedrigem Quotienten gehemmt.

2. Die Hemmung der Calciumaufnahme ist nicht die Folge einer direkten Oxidation membranständiger Thiolgruppen.

3. Dagegen führt eine direkte Oxidation extrazellulärer Thiole, wenn eine intrazelluläre Oxidation gleichzeitig verhindert wird, zur Steigerung der Calciumaufnahme.

4. Da diese Wirkung nur bei einem hohen intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten erfolgt, nicht jedoch wenn dieser erniedrigt ist, kann angenommen werden, daß der Redoxzustand extrazellulärer Thiole vom Redoxzustand des intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten abhängig ist.

5. Die vorliegenden Befunde sprechen dafür, daß die Oxidation extrazellulärer Thiole durch Thioloxidantien zur Steigerung der Calciumaufnahme führt und das Ausmaß der Calciumaufnahme um so höher ist, je mehr vor der Oxidation der Redoxzustand der extrazellulären Thiole auf der reduzierten Seite lag.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Ammon, H.P.T. (1973):
Stimulierung der Insulinsekretion durch Tolbutamid. Untersuchungen beim experimentellen Diabetes.
Arzneim.-Forschung (Drug Res.) 23, 1675-1676

Ammon, H.P.T., Verspohl, E. (1976):
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99, 1469-1476

Ammon, H.P.T., Akhtar, M., Niklas, H., Hegner, D. (1977):
Inhibition of p-chlormercuribenzoate- and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide, and tert.-butyl hydroperoxide.
Mol. Pharmacol. 13, 598-605

Ammon, H.P.T., Akhtar, M., Grimm, A., Niklas, H. (1979):
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH/GSSG ratios and tolbutamide mediated insulin release in vitro.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.307, 91-96

Ammon, H.P.T., Grimm, A., Lutz, S., Wagner-Teschner, D., Händel, M., Hagenloh, I. (1980):
Islet glutathione and insulin release
Diabetes 29, 830-834

Ashby, J.P., Speake, R.N. (1975):
Insulin and glucagon secretion from isolated islets of Langerhans. The effect of calcium ionophores.
Biochem. J. 150, 89-96

Ashcroft, S.J.H. (1980):
Review Articles. Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosythesis.
Diabetologia 18, 5-15

Ashcroft, S.J.H., Randle, P.J., Täljedal, I.-B. (1972):
Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in normal mouse pancreatic islets.
Febs Lett. 201, 263-266

Baker, P.F., Meves, H., Ridgway, E.B. (1973 a):
Effects of manganese and other agents on the calcium uptake that follows depolarisation of squid axons.
J. Physiol. Lond. 231, 511-526

Baker, P.F., Meves, H., Ridgway, E.B. (1973 b):
Calcium entry in response to maintained depolarisation of squid axons.
J. Physiol. Lond. 231, 527-548

Baker, P.F., Schlaepfer, W. (1975):
Calcium uptake by axoplasm extruded from giant axons of Loligo.
J. Physiol. Lond. 249, 37-38

Berridge, M.J. (1975):
The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity.
In: Advances in cyclic nucleotide research,
Eds.: P. Greengard, G.A. Robison, Bd. 6, 1-98,
Raven Press Publishers, New York

Blaustein, M.P. (1974):
The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 70, 33-82

Bloom, G.D., Hellman, B., Idahl. L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1972):
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic B-cells. Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure.
Biochem. J. 129, 241-254

Bloom, G.D., Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1977):
Glucose-stimulated and La3+-nondisplaceable Ca2+ pool in pancreatic islets.
Am. J. Physiol. 232(2) E114-E118

Boschero, A.C., Kawazu, S., Duncan, G., Malaisse, W.J. (1977):
Effect of glucose on K^+handling by pancreatic islets.
Febs Lett. 83, 151-154

Breemen, C. van, Farinas, B.R., Gerba, P., McNaughton, E.D. (1972):
Excitation-contracting coupling in rabbit aorta studied by the lanthanum method for measuring cellular calcium influx.
Circulation Res. 30, 44-54

Brisson, G.R., Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J. (1972):
The stimulus secretion coulpling of glucose induced insulin release. VII. A proposed site of action for adenosine-3'-5'-cyclic monophosphate.
J. Clin. Invest. 51, 232-241

Bukowiecki, L., Freinkel, N. (1976):
Relationship between ionic calcium and phosphorus during excitation of pancreatic islets with glucose.
Biochim. Biophys. Acta 436, 190-198

Carafoli, E., Malmström, K., Capano, M., Siegel, E., Crompton, M. (1975):
Mitochondria and the regulation of cell calcium.
In: Calcium transport in cotraction and secretion.
Eds.: E. Carafoli, F. Clementi, W. Drabikowski, A. Margreth; North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 53-64

Cerasi, E. (1975):
Mechanisms of glucose stimulated insulin secretion in health and in diabetes: Some reevaluationes and proposals.
Diabetologia 11, 1-13

Chandler, D.E., Williams, J.A. (1974):
Pancreatic acinar cells: effects of lanthanum ions on amylase release and calcium ion fluxes.
J. Physiol. Lond. 243, 831-846

Charles, M.A., Lawecki, J., Steiner, A.L., Grodsky, G.M. (1976):
Cyclic nucleotides in pancreatic islets. Tolbutamide- and arginine-induced insulin release.
Diabetes 25, 256-259

Christensen, A.K. (1969):
A way to prepare frozen thin sections of fresh tissue for electron microscopy.
In: Autoradiography of diffusible substances.
Eds.: L.J.Roth, W.E. Stumpf.
Academic Press, New York, London 349-362

Conaway, H.H., Griffey, M.A., Marks, S.R., Whitney. J.E. (1976)
Ionophore A 23 187 induced insulin secretion in the isolated, perfused dog pancreas
Horm. Metabol. Res. 8, 351-535

Curry, D.L., Bennett, L.L., Grodsky, G.M. (1968):
Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas.
Am. J. Physiol. 214, 174-178

Dean, P.M., Matthews, E.K. (1970):
Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells.
J. Physiol. Lond. 210, 255-264

Douglas, W.W., Ishida, A., Poisner, A.M. (1965):
The effect of metabolic inhibitors on the release of vasopressin from isolated neurohypophysis
J. Physiol. Lond. 181, 753

Erlichman, J., Schubart, U., Fleischer, N. (1979):
Sulfhydryl reagent-induced insulin release and $^{45}Ca^{2+}$ fluxes in Syrian hamster insolinoma cells.
Endocrinology 105, 1183-1190

Eujen, R. (1979):
Zur Rolle des reduzierten Glutathions Langerhansscher Inseln der Ratte bei der Sekretion von Insulin.
Dissertation Tübingen

Formby, B., Capito, K., Egeberg, J., Hedeskov, C.J. (1976):
Ca-activated ATP-ase activity in subcellular fractions of mouse pancreatic islets.
Am. J. Physiol. 230, 441

Frankel, B.J., Kromhout, J.A., Imagawa, W., Lnandahl, H.D., Grodsky, G.M. (1978):
Glucose stimulated ^{45}Calcium Uptake in Isolated Rat Islets
Diabetes 27, 365-369

Frerichs, H., Reich, U., Creutzfeld, W. (1965):
Insulin secretion in vitro
Klin. Wochenschr. 43, 136-141

Grasetti, D.R. (1969):
Some biochemical effects of thione-forming disulfids and their use in the study of cell thiols.
Ann. Ist. Sup. Sanita 5, 645

Grasetti, D.R., Murray Jr., J.F. (1970):
Modification of external sulfhydryl groups of Ehrlich ascites tumor cells with 6,6'-dithiodinicotinic acid.
Biochem. Pharmacol. 19, 1836

Grill, V., Cerasi, E. (1975):
Glucose induced cAMP accumulation in rats islets of Langerhans: preferential effect of the α-anomer.
Febs Lett. 54, 80-83

Grodsky, G.M. (1972):
A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin. II. Effect of calcium.
Diabetes 21, Suppl. 2, 584-593

Gylfe, E., Hellman, B. (1978):
Calcium and pancreatic cell function. 2. Mobilisation of glucose sensitive ^{45}Calcium from perifused islets rich in B-cells.
Biochim. Biophys. Acta 538, 249-257

Händel, M. (1978):
Pentosephosphatshunt Langerhansscher Inseln und Insulinsekretion.
Dissertation Tübingen

Hahn, H.-J., Gylfe, E., Hellman, B. (1979):
Glucose-dependent effect of methylxanthines on the ^{45}Ca distribution in pancreatic B-cells.
Febs Lett. 103, 348-351

Hanks, J.H., Wallace, E.R. (1949):
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196-200

Hellman, B. (1975 a):
Modifying actions of calcium ionophores on insulin release.
Biochim. Biophys. Acta 399, 157-169

Hellman, B. (1975 b):
The effect of calcium and divalent ionophores on the stability of isolated insulin secretory granules.
Febs Lett. 54, 343-346

Hellman, B. (1978):
Calcium and pancreatic B-cell function. 3. Validity of the La^{3+} -wash technique for discriminating between superficial and intracellular ^{45}Ca.
Biochim. Biophys. Acta 540, 534-542

Hellman, B. (1977):
Mechanism of insulin secretion.
In: Regulatory Mechanisms of Carbohydrate Metabolism, edited by V. Esman. Oxford: Pergamon 42: 41-50

Hellman,B., Andersson, T. (1978):
Calcium and pancreatic B-cell function. 4. Evidence that glucose and phosphate stimulate ^{45}Calcium incorporation into different intracellular pools.
Bichim. Biophys. Acta 541, 483-491

Hellman, B., Gylfe, E. (1978):
Calcium and pancreatic B-cell function: Glucose stimulation of calcium uptake of Lanthanum-displaceable ^{45}Ca from low or normal calcium-containing media.
Horm. Metabol. Res. 10, 29-31

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1971):
Calcium uptake by pancreatic B-cells as measured with the aid of ^{45}Ca and mannitol-3H.
Am. J. Physiol., 221, 1795-1801

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1973):
Iodacetamide- induced sensitization of pancreatic B-cells to glucose stimulation.
Biochem. J. 132, 775-789

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1974):
Membrane sulfhydryl groups and pancreatic beta cell recognation of insulin secretagogues.
In Diabetes. W.J. Malaisse and J. Pirart, Eds.
65-68 Excerpta Medica, Amsterdam

Hellman, B., Sehlin, J., Söderberg, M., Täljedahl, I.-B. (1975):
The mechanism of action of chloromercurobenzene-p-sulfonic acid as insulin secretagogue: Fluxes of calcium, sodium, and rubidium in islets exposed to mercurial and a membrane-active antagonist.
J. Physiol. Lond. 252, 701-712

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1976 a):
Effects of glucose on ^{45}Ca uptake by pancreatic islets as studied with the lanthanum method.
J. Physiol. Lond. 254, 639-656

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1976 b):
Calcium and secretion: Distinction between two pools of glucose-sensitiv Calcium in pancreatic islets.
Science 194, 1421-1423

Hellman, B., Lenzen, S., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1977):
Effect of various modifiers of insulin release on the Lanthanum-non-displaceable $^{45}Ca^{2+}$ uptake by isolated pancreatic islets.
Diabetologia 13, 49-53

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lenzen, S., Sehlin, J., Täljedahl, I.-B. (1978):
Further studies on the relationship between insulin release and Lanthanum-non-displaceable $^{45}Ca^{2+}$ uptake by pancreatic islets: Effects of fructose and Starvation.
Endocrinology 102, 1856-1863

Henquin, J.C., Lambert, A.E. (1974):
Cations environment and dynamics of insulin secretion. II. Effect of a high concentration of potassium.
Diabetes 23, 933-942

Henquin, J.C., Lambert, A.E. (1975):
Cobalt inhibition of insulin secretion and calcium uptake by isolated rat islets.
Am. J. Physiol. 228, 1669-1677

Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1978):
Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: dissociation between calcium and insulin release.
J. Physiol. Lond. 283, 409-424

Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1980):
Regulation of calcium fluxes in pancreatic islets: two calcium movements' dissociated response to glucose.
Am. J. Physiol. 238, E87-E95

Herman, L., Sato, T., Hales, C.N. (1973):
The electron microsopic localisation of cations to pancreatic islets of Langerhans and their possible role on insulin secretion.
J. Ultrastructure Res. 42, 298-311

Howell, S.L., Motague, W., Tyhurst, M. (1975):
Calcium distribution in islets of Langerhans. A study of calcium concentrations and of calcium accumulation in B-cell organelles.
J. Cell. Sci. 19, 395-409

Hurwitz, L., Fitzpatrick, D.F., Debbas, G., Landon, E.J. (1973):
Localisation of calcium pump activity in smooth muscle.
Science 179, 384-386

Iversen, J., Miles, D.W. (1971):
Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated, perfused canine pancreas.
Diabetes 20, 1-9

Kikuchi, M., Cuendet, G.S., Renold, A.E., Sharp, G.W.G. (1976):
Kinetic study of glucose effect on ^{45}Ca efflux and insulin release from 46 hour-preloaded rat islets at different temperatures and Ca^{2+} concentrations.
(Abstract) Diabetologia 12, 402

Kikuchi, M., Wollheim, C.B. Cuended, G.S., Renold, A.E. Sharp, G.W.G. (1978):
Studies on the dual effect of glucose on $^{45}Ca^{2+}$ efflux from isolated rat islets.
Endocrinology 102, 1339-1349

Kilgus, G. (1981)
unveröffentlichte Ergebnisse, Diplomarbeit Tübingen

Kosower, E.M., Kosower, N.S., Kenety-Londner, H., Levy, L. (1974):
Glutathione IX. New thiol-oxidizing agents: DIP, DIP+1, DIP+2.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 347-351

Kosower, E.M., Kanety-Londner, H. (1976):
Glutathione 13. Mechanism of thiol oxidation by diazenedicarboxylic acid derivates.
J. Am. Chemical Soc. 98:10, 3001-3007

Kuo, W.N., Hodgins, D.S., Kuo, J.F. (1973):
Adenylate cyclase in islets of Langerhans. Isolation of islets and regulation of adenylate cyclase activity by various hormones and agents.
J. Biol. Chem. 248, 2705-2711

Lacy, P.E., Kostianovsky, M. (1967)
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35-39

Lacy, P.E. (1975):
Endocrine secretory mechanisms.
Amer. J. Path. 79, 170-187

Lambert, A.E., Jeanrenaud, B., Junod, A., Renold, A.E. (1969):
Organ culture of fetal rat pancreas. II. Insulin release induced by amino and organic acids, by hormonal peptides, by cationic alterations of the medium and by other agents.
Biochim. Biophys. Acta 184, 54/-553

Lernmark, A., Hellman, B. (1970):
Effect of epinephrine and mannoheptulose on early and late phases of glucose-stimulated insulin release.
Metabolism 19, 614-618

Little-Dike, E.T., Witzel, D.A., Whipp, S.C. (1968):
Insulin: Evidence for inhibition of release in spontaneous hypocalcemia
Proc. Soc. exp. Biol. 129,135-139

Löffler, G., Kemmler, W. (1975):
Cation dependent ATPases in rat islet cell membranes.
Diabetologia 11, 359

Malaisse, W.J. (1968):
Étude de la sécrétion insulinique in vitro.
Brussles: Editions Arsica

Malaisse, W.J. (1973):
Insulin Secretion: Multifactorial regulation for a single release process.
Diabetologia 9, 167-173

Malaisse-Lagac, F., Malaisse, W.J. (1971)
Stimulus-secretion coupling of glucose induced insulin release. III. Uptake of ^{45}Calcium by isolated islets of Langerhans.
Endocrinology 88, 72-80

Malaisse, W.J., Brisson, G.R., Baird, L.E. (1973):
Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. X. Effect of glucose on ^{45}Calcium efflux from perifused islets.
Am. J. Physiol., 224, 389-394

Malaisse, W.J., Devis, G., Herchuelz, A., Sener, A., Somers, G. (1976):
Calcium antagonists and islets function. VIII. The effect of magnesium.
Diabète Métab. 2, 1-4

Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Sener, A., Levy, J., Herchuelz, A., Devis, G., Somers, G. (1977):
Calcium antogonists and isltes function. VII. Effect of calcium deprivation.
J. Membr. Biol. 38, 193-108

Malaisse, W.J., Sener, A., Boschero, A.C., Kawazu, S., Devis, G., Somers, G. (1978 a):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Cationic and secretory effects of menadione in the endocrine pancreas.
Eur. J. Biochem. 87, 111-120

Malaisse, W.J., Herchuelz, A., Devis, G., Somers, G., Boschero, A.C., Hutton, J.C., Kawazu, S., Sener, A., Atwater, I.J., Duncan, G., Ribalet, B., Rojas, B. (1978 b):
Regulation of calcium fluxes and their regulatory roles in pancreatic islets.
In: Calciumtransport and cell function.
Eds.: A. Scarpa, E. Carafoli
Annals of the New York Acad. of Sciences 307, 562-582

Malaisse, W.J., Hutton, J.C., Kawazu, S., Herchuelz, A., Valverde, I., Sener, A. (1979):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXXV. The links between metabolic and cationic events.
Diabetologia 16, 331-341

Matschinsky, F.M., Ellermann, J.E. (1968)
Metabolism of glucose in the islets of Langerhans.
J. Biol. Chem. 243, 2730-2736

Matthews, E.K. (1975):
Calcium and stimulus-secretion coupling in pancreatic islet cells.
In: Calcium transport in contraction and secretion.
Eds.: E. Carafoli, F. Clementi, W. Drabikowski, A. Margreth
North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford, 203-210

Milner, R.D.G., Hales, C.N. (1967):
The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studies in vitro.
Diabetologia 3, 47-49

Montague, W. (1977):
Cyclic nucleotides, calcium and insulin secretion.
In: Cyclic 3',5'-nucleotides: Mechanisms of action.
Eds.: H. Cramer, J. Schultz
Wiley & Sons, London, New York, Toronto, 133-146

Muller, R.U., Finkelstein, A. (1974):
The electrostatic basis of magnesium inhibition of transmitter release.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 923-926

Naber, S.P., McDaniel, M.L., Lacy, P.E. (1977):
The effect of glucose on the acute uptake and efflux of ^{45}Calcium in isolated rat islets.
Endocrinology 101, 686-693

Panten, U., Christians, J., Kriegstein, E.V., Poser, W., Hasselblatt, A. (1974):
Effect of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perifused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 9, 477-482

Randle, P.J., Ashcroft, S.J.H., Gill, J.H. (1968):
Carbohydrate metabolism and release of hormones.
In: Dickens, F., Randle, P.J., Whelan, W.J. (Eds.)
Vol. 1 Academic Press, London, 427-447

Rappaport, A.M., Ohira, S., Coddling, J.A., Empey, G., Kalnins, A., Lin, B.J., Haist, R.E. (1972):
Effects on insulin output and on pancreatic blood flow of exogenous insulin infusion into an "in situ" isolated portion of the pancreas.
Endocrinology 91, 168

Rasmussen, H. (1970):
Cell communication, Calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate.
Science 170, 404-412

Ravazzola, M., Malaisse-Lagae, F., Amherdt, M., Perrelet, A., Malaisse, W.J., Orci, L. (1976):
Patterns of calcium localisation in pancreatic endocrine cells.
J. Cell. Sci. 27, 107-117

Ribes, G., Siegel, E.G., Wollheim, C.B., Renold, A.E., Miller, R.E. (1981):
Rapid changes in calcium content of rat pancreatic islets in response to glucose.
Diabetes 30, 52-55

Rink, H. (1974):
Thiol compounds in radiation biology.
In: glutathione. Proc. of the 16th Confernce of the german society of biological chemistry (Eds.: L. Flohé, R.C. Benöhr, H. Siess, H.D. Waller, A. Wendel.)
Georg Thieme Pub. Stuttgart, 206-216

Rink, T.J. Baker, P.F. (1975):
The role of the plasma membrane in the regulation of intracellular calcium.
In: Calcium transport in contraction and secretion. Eds.: E. Carafoli, F. Clementi, W. Drabikowski, A. Margreth. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford, 235-242

Robertson, W.G. (1976):
Cellular calcium and calcium transport.
In: Calcium , phosphate and magnesium metabolism. Eds.: B.E.C. Nordin. Churchill Livingston, Edinburgh, London, New York, 230-256

Schäfer, H. (1980):
Zellcalcium und Zellfunktion,
Veröffentlichungen aus der Pathologie 109, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Schäfer, H.-J., Klöppel, G. (1974 a):
Demonstration of calcium in pancreatic islets. Light microscopic observations in activated and inactivated B-cells of mice.
Virchows Arch. A Path. Anat. and Histol. 362, 1-12

Schäfer, H.-J., Klöppel, G. (1974 b):
The significance of calcium and insulin secretion. Ultrastrucural studies on identification and localisation of calcium in activated and inactivated B-cells of mice.
Virchows Arch. A Path. Anat. Histol. 362, 231-245

Schatzmann, H.J. (1975):
Active calcium transport across the plasma membrane of erythrocytes.
In: Calcium transport in contraction and secretion. Eds.: E. Carafoli, F. Clementi, W. Drabikowski, A. Margreth. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford 45-49

Schofield, J. (1971):
Effect of sulfhydryl reagents on the release of ox grouth hormone in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 252, 516

Sener, A., Hutton, J.C., Kawazu, S., Boschero, A.C., Somers, G., Devis, G., Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1978 a):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic and functional effects of NH_4^+ in rat islets.
J. Clin. Invest. 62, 868-878

Sener, A., Kawazu, S., Hutton, J.C., Boschero, A.C., Devis, G., Somers, G., Herchuelz, A., Malaisse, W.J. (1978 b):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induces insulin release. Effect of exogenous pyruvate upon islet function.
Biochem. J. 176, 217-232

Sharp, G.W.G. (1975):
Studies on the mechanism of insulin release.
Fed. Proc. 34, 1537-1548

Somers, G., Devis, G., Malaisse, W.J. (1979):
Calcium antagonists and islet function. IX. Is extracellular calcium required for insulin release?
Acta diabet. lat. 16, 9-18

Sugden, M.C., Ashcroft, S.J.H. (1977):
Phosphoenolpyruvate in rat pancreatic islets: a possible intracellular trigger of insulin release?
Diabetologia 13, 481-486

Sugden, M.C., Ashcroft, S.J.H. (1978):
Effects of Phosphoenolpyruvate, Other Glycolytic Intermediates and Methylxanthines on Calcium Uptake by a Mitochondrial Fraction from Rat Pancreatic Islets.
Diabetologia 15, 173-180

Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.P. (1972):
Manometric and biochemical techniques.
5th edition, Burgess Pub. Co., Minneapolis USA, p. 146

Veech, R.L., Eggleston, L.V., Krebs, H.A. (1969):
The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver.
Biochem. J. 115, 609-619

Verspohl, E.J., Händel, M., Ammon, H.P.T. (1979):
Pentose phosphate shunt activity of rat pancreatic islets: Its dependence on glucose concentration.
Endocrinology 105, 1269-1274

Verspohl, E.J., Hagenloh, I., Händel, M., Grether, A. (1981):
In vitro inhibition of glucose- leucine- arginine- and tolbutamide-induced insulin secretion by exogenous insulin.
Abstract 183, Naunyn Schmiedebergs Arch. of. Pharmacol. Suppl. to Vol 316

Watkins, D.T., Moore, M. (1974):
Effect of sulfhydryl-binding reagents on insulin release from isolated secretion granules,
Endocrinology 95, 485

L E B E N S L A U F

Rolf Gottfried Hägele
geboren am 8. Juli 1950 in Balingen/Württ.

Vater: Gottlieb Hägele, Stadtamtsrat
gestorben am 26. Februar 1965

Mutter: Lore Hägele, geb. Friedrich

verheiratet mit der Apothekerin Helga Hägele,
geb. Frey, seit 5. März 1976

Geburt des Sohnes Michael am 21. Februar 1979

Schulischer Werdegang:

1957 Grundschule in Balingen/Württ. von April 1957 bis März 1961

1961 Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Balingen/Württ. von April 1961 bis Juni 1969

1969 Ablegung der Reifeprüfung am 16. Juni

Beruflicher Werdegang:

1969 Apothekerpraktikum in der Dr. Linz'schen Apotheke am Marktbrunnen in Tübingen vom 1. Oktober 1969 bis 30. September 1971

1971 Ablegung der Pharmazeutischen Vorprüfung am 3. September

1971 Apothekentätigkeit als Vorexaminierter in der Dr. Linz'schen Apotheke am Marktbrunnen in Tübingen vom 1. Oktober 1971 bis März 1975

1975 Studium der Pharmazie an der Universität Tübingen von April 1975 bis September 1978

1977 1. Pharmazeutisches Staatsexamen am 4. April

1978 2. Pharmazeutisches Staatsexamen am 11. September

Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im November 1978 am Lehrstuhl für Pharmakologie am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon

Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie seit 1. November

1981 Abschluß der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im April

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren H. Auterhoff, J. Schultz, K.-A. Kovar (Pharmazeutische Chemie); E. Graf, H. Hamacher (Pharmazeutische Technologie); E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie); E. Lindner, E. Bayer (Chemie); R.E. Bader (Hygiene); H. Seiler (Physik); M. Siess (Pharmakologie)

Druck und Gesamtherstellung:

Bölk & Schulz · Kopier- und Drucktechnik
Bismarckstr. 92
7400 Tübingen · Tel. 07071/32321